農業生物資源研究所
研究資料

第1号　平成14年12月

クワ炭疽病の生理・生態学的研究 …… 1
吉田 重信

イネcDNAマイクロアレイ実験プロトコール …… 79
藤井 文子, 真保 佳納子, 矢崎 潤史, 岸本 直己, 菊池 尚志

(Protocols for experiments on rice cDNA microarray) …… 99
Fujii F, Shimbo K, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S

National Institute of Agrobiological Sciences
独立行政法人 農業生物資源研究所
Tsukuba, Ibaraki, Japan

生物研研究資料　No. 1
Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Sci.

ISSN 1347-9393

［生物研研究資料 No. 1：1-78（2002）］
［Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Sci.］

クワ炭疽病の生理・生態学的研究

吉田　重信[1)]

（2002年2月28日受理）

Key words: anthracnose, biological control, *Colletotrichum dematium*, ecology, mulberry

目　次

Ⅰ　緒　言 …… 2
Ⅱ　既往の研究 …… 3
Ⅲ　病原菌の分離と同定 …… 4
　1　分　離 …… 4
　2　同　定 …… 5
　3　考　察 …… 7
Ⅳ　クワ炭疽病菌の病原性 …… 8
　1　クワ葉に対する病原性 …… 8
　2　各種植物葉に対する病原性 …… 8
　3　他宿主由来の炭疽病菌との病原性の比較…… 12
　4　考　察 …… 15
Ⅴ　クワ炭疽病菌*C. dematium*に対するクワ品種間の感受性の差異 …… 19
　1　260品種間における感受性の差異 …… 19
　2　育成系統実生苗における感受性の差異…… 20
　3　考　察 …… 23
Ⅵ　クワ炭疽病菌*C. dematium*によるクワ炭疽病の発生生態 …… 25
　1　圃場における発病とその拡大 …… 26
　2　育苗床での激発と菌の伝搬経路 …… 27
　3　発病に及ぼす施肥の影響 …… 31
　4　土壌中および罹病葉での越冬 …… 33
　5　考　察 …… 35
Ⅶ　クワ炭疽病菌*C. dematium*の分生子の発芽・形成誘導因子および潜在感染の顕在化 …… 37
　1　クワ葉上での分生子発芽と初期感染…… 37
　2　葉中に含まれる分生子形成誘導因子…… 41
　3　クワ葉での潜在感染の顕在化 …… 45
　4　考　察 …… 46
Ⅷ　クワ炭疽病菌*C. dematium*感染罹病葉中に生産される毒素 …… 48
　1　罹病葉中での毒素の生産 …… 49
　2　毒素の役割 …… 51
　3　感染に関与する毒素の単離・精製…… 52
　4　考　察 …… 55
Ⅸ　クワ炭疽病菌*C. dematium*の生物的防除 …… 56
　1　拮抗細菌の分離と同定 …… 57
　2　拮抗細菌の培養液による生物的防除…… 58
　3　拮抗細菌の生産する抗菌成分の単離・精製および同定 …… 61
　4　考　察 …… 65
Ⅹ　総合考察 …… 67
Ⅺ　要　約 …… 70
Ⅻ　引用文献 …… 72
ⅩⅢ　Summary …… 76

1）旧蚕糸・昆虫農業技術研究所　生産技術部　桑病害研究室，305-8634 茨城県つくば市大わし1-2
現：農業環境技術研究所　農業環境インベントリーセンター　微生物分類研究室，305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

Ⅰ 緒 言

我が国における養蚕業の起源は古く，２世紀末まで溯るとされている（直井，1995）．やがて絹は衣服素材としての価値が認められ，絹製品は高い芸術性を有する衣文化を形成するに至った．その後産業革命が起き，機械化に伴う大量生産が可能になると，蚕糸業は一大産業へと成長していった．こうして19世紀後半～20世紀前半には，蚕糸業が経済の根幹となるほど盛んになり，クワ栽培も蚕糸業の発展とともにその栽培規模，収量を伸ばした．ところが，第二次世界大戦後になると，ナイロン等の絹に変わりうる合成繊維の出現のため，絹糸の需要は激減し，それに伴って桑園面積，繭生産および養蚕農家戸数は著しく減少することとなった．また，近年では安価な外国産絹製品の急増により，農家や製糸業者は大きな打撃を受けている．こうした背景のもとに，1930年には約70万haあったクワの栽培面積は1997年には1.3万ha足らずとなった．しかし蚕の給餌用としてのクワの重要性は，人工飼料等が実用化されてきているにもかかわらず，今日でも変わっていない．また近年になると，葉や実を用いた健康食品や根を用いた医薬等，クワの多面的な利用が行われるようになり（小山，1993；小貫，1988；塚本，1998），今後はより多方面の分野から注目されると考えられる．

我が国のクワの育種・栽培技術分野においては，それぞれの時代を反映して，先人達により品種や技術についてさまざまな創出や改良がなされており（片桐，1995；直井，1995），その研究蓄積は膨大な量となっている．一方，クワの病害に関する研究の歴史も古く（石川，1922），1890年に萎縮病と紫紋羽病が報告されたのを皮切りに，年代の経過とともに新病害の発生が報告され，1990年までには50種の病害が知られるようになった（白田，1995；日本植物病理学会，1990）．また，クワの病害発生は，クワ栽培技術の変遷と密に関連する場合がある．例を示すと，1970年代になり枝枯性の糸状菌および細菌病が多発するようになったが，これは，条桑収穫技術の普及で収穫時の条切断面が格好の感染部位となったことに起因している（白田，1995）．

クワ炭疽病は，こうした病害発生の歴史の中で，1925年に原摂祐により初めて報告された．本病は，葉に赤褐色～褐色あるいは灰白色の病斑または条斑を引き起こす葉枯性の病害で，毎年普遍的に発生するにもかかわらず，甚大な被害を及ぼすことは稀であり，萎縮病，紋羽病，胴枯・芽枯病等の病害と比較して，さほど重要視されていなかった．しかし，近年開発されたクワ栽培技術，すなわち密植栽培・機械収穫および多回育養蚕用のローリング収穫法等の普及により，本病の発生が目立つようになってきた．激しい場合には株全体の葉が発病し，ほとんど収穫できないほどの被害になる例も見られている．また近年，養蚕農家の高齢化および後継者不足等による桑園管理の不徹底が目に付くようになっており，本病の発生は今後さらに増加することが予想されている（白田，1996）．しかしながら，本病の生理・生態および防除法等に関する報告は，原（1925；1936；1942；1951），木村（1979），高橋（1988）による短文の記載があるだけで，不明な点が多く，効果的な本病の防除法確立に結びつくような詳細な研究は行われていない．

他方，炭疽病は果樹，野菜，花卉，食用作物，樹木等，世界各国の多様な植物種の各器官で発生する重要な植物病害の１群であり（池上，1984a；池上，1984b；Bailey and Jeger，1992），それらはいずれも不完全菌類の*Colletotrichum*属あるいは子嚢菌類の*Glomerella*属の数種病原菌により引き起こされる．こうした各種炭疽病菌とクワ炭疽病菌の異同については全く研究されておらず，また，炭疽病で良く知られている潜在感染についても十分な知見は得られていない．クワを宿主とする炭疽病菌の病原性，発生生態，感染生理等を解明することは，本菌の病理学的観点だけでなく異宿主間の寄生性分化等の観点においても重要である．

本研究では，クワ炭疽病，特に主たる病原菌であることが明らかとなった*C. dematium*による本病の生理・生態の解明に加え，効果的な防除法の確立の手掛かりを得ることを目的とし，以下の７章からなる研究を行った．

第Ⅲ章では，全国のクワ罹病葉から炭疽病菌を分離し，Arx（1957），Sutton（1980）らによる炭疽病菌の新分類体系に基づいて同定を行い，クワ炭疽病菌の種名を再検討した．

第Ⅳ章では，分離・同定した３種の炭疽病菌のクワ

および各種植物葉に対する病原性を調べるとともに，他の宿主由来の炭疽病菌とのクワに対する病原性を比較した．

第Ⅴ章では，当研究所で栽培・保存しているクワ260品種を用い，主たるクワ炭疽病菌の*C. dematium*に対する感受性程度を調べ，感受性および抵抗性品種を検索した．

第Ⅵ章では，当研究所内の桑園圃場において，発病の定点調査を行い，*C. dematium*による本病の発生消長を明らかにするとともに，本菌の伝搬経路および越冬形態について調べた．また，クワ葉の時期別・葉位別での感受性の差異，およびクワの肥培条件と発病との関連についても検討した．

第Ⅶ章では，*C. dematium*の分生子発芽および形成を支配する因子を探索するとともに，クワ葉における*C. dematium*の潜在感染の有無および感染の誘発法について検討した．

第Ⅷ章では，*C. dematium*により形成されたクワ葉病斑部での毒素生産を明らかにするとともにその役割について検討し，毒素の単離・精製を行った．

第Ⅸ章では，*C. dematium*の生物的防除のための拮抗細菌を分離・同定し，その細菌による発病抑制効果について検討した．また，本細菌の生産する抗菌成分を単離・精製するとともに，その化学構造を明らかにした．

なお，本論文は，1992年から2000年まで蚕糸・昆虫農業技術研究所で行った一連の研究成果（吉田ら，1995a, b；吉田・白田，1996a, b；吉田・白田，1997；Yoshida and Shirata，1998a, b, c；Yoshida and Shirata，1999a, b；Yoshida and Shirata，2000；Yoshida *et al.*，2000a, b；Yoshida *et al.*，2001）を取りまとめたものである．クワ品種間の感受性差異の研究は，吉田滋実氏（東京都農業試験場）（吉田ら，1995a）と，罹病葉中からの毒素および拮抗細菌の生産する抗菌成分の単離・精製，同定については，平舘俊太郎博士（農業環境技術研究所）および畑田清隆博士（東北工業技術研究所）（Yoshida *et al.*，2000a；Yoshida *et al.*，2001）と著者とが共同研究して行ったものである．

また，本研究の遂行にあたり，終始懇切丁寧な御指導を頂いた蚕糸・昆虫農業技術研究所，前桑病害研究室長・白田昭博士（現，農業生物資源研究所，研究交流科長）に対し，厚く御礼申し上げます．また，一部共同研究をお願いした，小林享夫博士（東京農業大学教授），平舘俊太郎博士（農業環境技術研究所），吉田滋実氏（東京都農業試験場）および畑田清隆博士（東北工業技術研究所）には，多大な御支援を頂いた．さらに，前桑病害研究室長・矢澤盈男博士，同研究室員・村上理都子氏，塚本貴敬氏，前桑育種研究室および桑栽培生理研究室の各位には，実験遂行上の御助言と御協力を頂いた．以上の各位に対し，心から感謝の意を表します．

また，本論文の御校閲等の労を頂いた東北大学農学部教授・羽柴輝良博士，同名誉教授・江原淑夫博士，農業環境技術研究所微生物分類研究室長・對馬誠也博士，並びに前桑病害研究室長・白田昭博士に対して，深く感謝いたします．

Ⅱ　既往の研究

我が国におけるクワ炭疽病の報告は，原摂祐（1925）が，「実用作物病理学」で記載したのが最初であり，この中で，本病の病原菌を新種*Colletotrichum morifolium*として記載した．その後，原は数種の書物（原, 1936；原, 1942；1951）において，本病の病徴，*C. morifolium*の形態および防除法等について短く記載している．1954年には，クワ葉から分離した菌を，その形態から新種*C. morina*として記載（原，1954）したが，その病原性等については記載されていない．また，宮城（1929）は，新種の桑樹赤枯病菌として，*C. Mori* Miyagiと命名したが，原（1942）はこれを*C. morifolium*と同一であるとした．これにより我が国における本病の病原菌は，*C. morifolium*および*C. morina*の２種であることが，1950年代にほぼ確定した．

一方，1930年代ごろから，炭疽病菌も属する不完全菌類において，完全世代との関連，分生子の形成方法に重点を置いた分類学的再検討が始まり（小林, 1993），その結果として，多くの属において分割および統合，再配分が行われた．こうした分類学的な潮流の下，炭疽病菌においてもArx（1957）により，大胆な再整理が行われた．すなわち，Arxはそれまで宿主により別種

として新種記載されてきた約800種の炭疽病菌の不完全世代を，完全世代との関係と形態および病原性等により，*Colletotrichum*属の11種12変種・型に再編した．この再編・整理については，当時賛否両論があったものの，後にSutton（1980）の詳細な分生子形成方法に基づく分類法の検討等により，Arxによる属の再整理，再配分が基本的に受け入れられ，現在の炭疽病菌の分類体系に至っている（佐藤，1993；小林，1993）．Arx（1957）による分類体系に準じて，山本（1960）は，日本産の炭疽病菌の種名と属名の改変を行っているが，その中で，クワ炭疽病菌*C. morifolium*を*C. dematium*の生態種，すなわち*C. dematium* f. *morifolium*と改変している．しかし，この改変はあくまでもArxによる*C. dematium*の生態種の配置に基づいたものであり，病原性等の詳細な検討はなされていない．さらに，小林（1993）は*C. morifolium*は形態的に*C. dematium*群に属するが，本病菌の種名については，さらに詳細な検討を要すると指摘している．

外国におけるクワ炭疽病の発生については，中国および台湾で報告されており，中国では*C. morifolium*（中国農業百科全書編集部編，1987）が，台湾では*C. morifolium*の他に*C. moricola*，*C. morinum*，*Glomerella mori*（Sawada，1959）が病原菌として記載されている．

また，我が国における本病の発生生態と防除については，原（1925；1936；1942；1951），木村（1979）および高橋（1988）により報告されている．原（1951）は，*C. morifolium*は被害部または枝条上に胞子または菌糸で越冬し，密植桑園および葉が硬化しやすい品種で発生が多いとしている．また，3斗式「ボルドウ」液の散布により，本病に防除効果を示すとしている（原，1942）．高橋（1988）は，本病はクワの全生育期間を通じて発生し，被害植物上で分生子および菌糸塊の形で越冬・伝染し，また，*C. morifolium*はクワにのみ寄生すると記している．しかし，本病に関する具体的な研究結果を示した報告は少なく，本病菌の種名，病原菌の生理的特性，感染様式等についてもほとんど解明されてはいない．

Ⅲ　病原菌の分離と同定

クワ炭疽病菌としては，原摂祐により1925年および1954年にそれぞれ*C. morifolium* Hara（原，1925）および*C. morina* Hara（原，1954）と命名された2種が知られていた（日本植物病理学会，1990）．しかし，Arx（1957），Sutton（1980）らによって新しい炭疽病菌の分類体系が提唱されてからは，山本（1960）がArx（1957）の報告を受けて*C. morifolium*を*C. dematium* f. *morifolium*に改変したにとどまり，詳細な検討は行われていなかった．そこで本章では，クワ罹病葉から炭疽病菌を分離し，炭疽病菌の新分類体系に基づいた同定により，種名の再検討を行った．

1．分　離

（1）材料および方法

全国の13県（岩手・福島・群馬・茨城・埼玉・千葉・神奈川・石川・山梨・長野・徳島・熊本・沖縄）より取り寄せた罹病クワ葉の病斑部を切り取り，切片を70％アルコールに約10秒，続いて２％次亜塩素酸ナトリウム溶液に２～３分間浸漬後，殺菌水で３回洗った．滅菌ろ紙で水分を吸い取った後，ジャガイモ煎汁・グルコース寒天培地（PDA：ジャガイモ 200g，グルコース 20g，寒天 18g，蒸留水 1ℓ）平板培地あるいはクワ葉煎汁・スクロース・寒天（MSA：乾燥クワ葉 50g，スクロース 30g，寒天 27g，蒸留水 1.5ℓ）平板培地上に置き約20℃に保った．数日後に伸長した菌糸先端を切り取ってPDAおよびMSA斜面培地上に移植し，生育後５℃で保存した．なお，これら菌株の大半は分生子形成が見られたので再度単胞子分離を行い，保存菌株とした．また，上記の方法で分離が困難だった葉においては，Ⅶ章の３で示した手法で葉の裏面に紫外線を３～５分照射した後，湿室に保って形成させた分生子層から直接単胞子分離を行った．

（2）結　果

分離菌株は，13県下の炭疽病病斑あるいは類似の病徴を示した罹病クワ葉から，炭疽病菌あるいはその類似菌66菌株を分離し，これに分譲頂いた２菌株（東京

都・高知県下の罹病葉より分離）を含め，合計68菌株を得た．このうち56菌株が炭疽病菌*Colletotrichum*属であった．それぞれの菌株の分離源病葉の採集地，採集年月日，分生子のタイプをTable 1に示した．なお，分離源としたクワ罹病葉の写真の一部はFig. 1-1, 2に示した．なお，*Colletotrichum*属以外の分離菌株は，*Phoma*属や*Nigrospora*属が多かった．

2．同　定

（1）材料および方法

菌の同定は，MSAまたはPDA平板培地上に形成した分生子および子のう胞子の形態により行った．なお，一部の菌株については葉上に形成させた分生子の形態も調べた．

（2）結　果

分離した*Colletotrichum*属菌56菌株は，分生子の形と大きさにより３つの群（Fig. 1-4, 5, 7）（Fig. 2）に分けられた．分離菌株中で最も多かったのは，分生子が鎌形（大きさ22.5～32.5×2～3 μm）のグループで35菌株であった．これらは分生子の形態や培養性状がArx（1957 ；1981），小林（1993），Sutton（1980）らによる*Colletotrichum dematium*（Persoon : Fries）Groveに一致し，同一種として同定した．次に多かったのは，分生子の形態が円筒形（大きさ12.5～22×4～7μm）のグループに属する11菌株で，このうち８菌株では成熟子のう殻とそれに伴う子のうおよび子のう胞子の形成が認められた（Fig. 1-6）．これらは，分生子および子のう殻や子のう胞子の形態から，Arx（1957），小林（1993）らによる完全世代の*Glomerella cingulata*（Stoneman）Spaulding et Schrenkとその不完全世代の*Colletotrichum gloeosporioides*

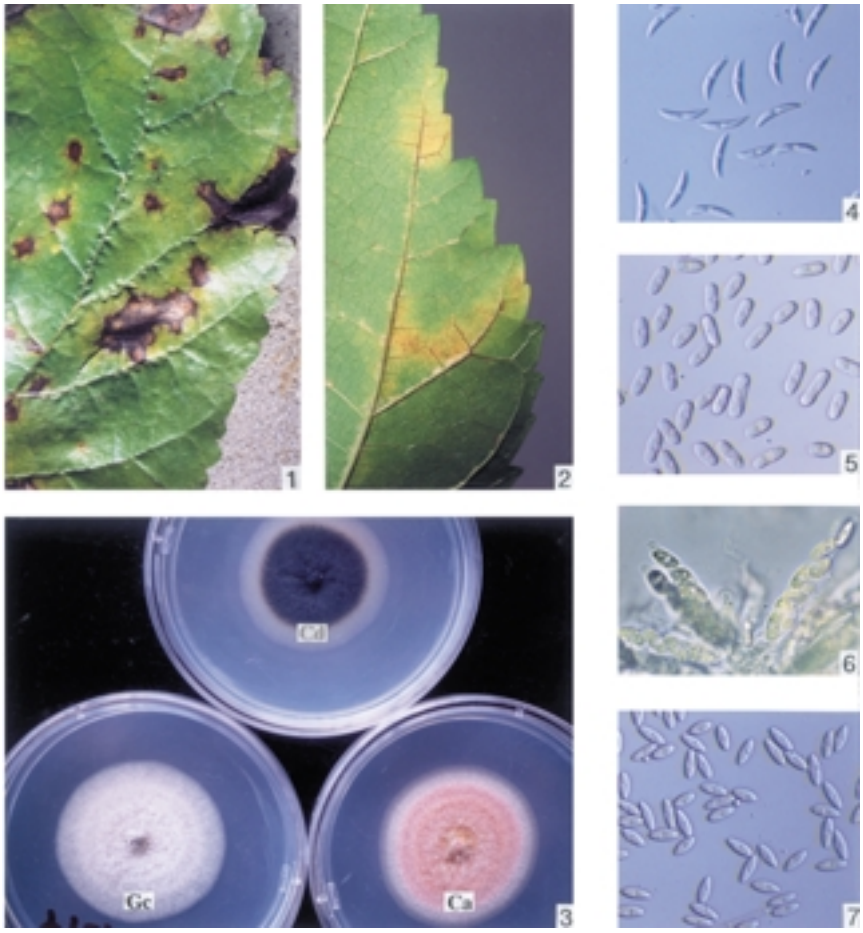

Fig. 1.
-1. Diseased mulberry leaf. *C. dematium* and *G. cingulata* were isolated from the lesions.
-2. Diseased mulberry leaf. *C. acutatum* was isolated from these lesions.
-3. Mycelial colony of mulberry anthracnose fungi on PDA plate: Cd, *C. dematium* S9269; Gc, *G. cingulata* S9274; Ca, *C. acutatum* S9303.
-4. Conidia of *C. dematium* S9269.
-5. Conidia of *G. cingulata* S9274.
-6. Asci and ascospore of *G. cingulata* S9244.
-7. Conidia of *C. acutatum* S9303.

Table 1. Anthracnose fungi isolated from diseased mulberry leaves and their pathogenicity to mulberry leaves

Isolate No.[a]	Geographic origin	Date of collection[b]	Conidial shape[c]	Lesion formation[d]			
				Punctured site[e]		Intact site[f]	
S9231*	Iwate	A	Fa	++	+++	+++	+++
S9232*	Iwate	A	Cy	–	–	–	–
S9233*	Iwate	A	Cy	–	–	–	–
S9234*	Iwate	A	Cy	–	–	–	–
S9235*	Fukushima	A	Fa	+	+++	+++	+++
S9236*	Fukushima	A	Fa	–	++	+++	+++
S9237	Fukushima	A	Fa	+	+	++	+++
S9238	Fukushima	A	Fa	++	+++	++	+++
S8901*	Ibaraki	B	Fa	++	++	+++	+++
S8902*	Ibaraki	B	Fa	–	+++	++	++
S8903*	Ibaraki	B	Fa	+++	+++	+++	+++
S8904*	Ibaraki	B	Fa	+	+	++	+++
S8909*	Ibaraki	B	Fa	–	++	+++	+++
S9211*	Ibaraki	C	Fa	++	+++	+++	+++
S9212*	Ibaraki	C	Fa	+	+	+++	+++
S9213*	Ibaraki	C	Fa	++	+++	+++	+++
S9214*	Ibaraki	C	Fa	++	++	++	+++
S9215*	Ibaraki	C	Fa	–	+++	+++	+++
S9301*	Ibaraki	D	Fu	–	+	+	++
S9302*	Ibaraki	D	Fu	++	++	+	+
S9303*	Ibaraki	D	Fu	–	+++	+	+
S9304*	Ibaraki	D	Fu	–	+	+	+
S9305*	Ibaraki	D	Fu	–	–	+	++
S9306*	Ibaraki	D	Fu	–	++	+	+
S9307*	Ibaraki	D	Fu	+	+++	+	+
S9308*	Ibaraki	D	Fu	–	++	+	+
S9391*	Ibaraki	E	Fu	–	–	+	+
S9392*	Ibaraki	E	Fu	–	+	+	++
S9239	Gunma	A	Fa	+	++	+++	+++
S9240*	Gunma	A	Fa	++	+++	+++	+++
S9241*	Gunma	A	Fa	–	–	–	–
S9243*	Saitama	A	Cy	–	–	–	–
S9244*	Saitama	A	Cy	–	–	–	–
S9245*	Saitama	A	Cy	–	++	–	+
S9246	Chiba	A	Fa	–	–	++	+++
S9247*	Chiba	A	Fa	+	++	+++	+++
6011**	Tokyo	F	Cy	–	++	–	–
S9250	Kanagawa	A	Fa	–	+++	++	++
S9253*	Ishikawa	A	Fa	–	–	+++	+++
S9254*	Ishikawa	A	Fa	+++	+++	+++	+++
S9255*	Ishikawa	A	Fa	++	++	+++	+++
S9256	Yamanashi	A	Fa	–	+++	+++	+++
S9257*	Yamanashi	A	Cy	–	–	–	–
S9261*	Nagano	A	Fa	+++	+++	+++	+++
S9262*	Nagano	A	Fa	+++	+++	++	+++
S9263*	Nagano	A	Fa	+	+++	+++	+++
S9264	Nagano	A	Fa	+++	+++	+++	+++
S9265	Tokushima	A	Fa	++	+++	++	+++
No1**	Kochi	G	Fa	++	+++	++	+++
S9268	Kumamoto	A	Fa	+++	+++	++	+++
S9269*	Kumamoto	A	Fa	+	+++	+++	+++
S9270*	Kumamto	A	Fa	+++	+++	+++	+++
S9271*	Kumamoto	A	Fa	++	++	++	++
S9274*	Okinawa	A	Cy	–	–	–	+
S9275*	Okinawa	A	Cy	–	+	–	–
S9276*	Okinawa	A	Cy	–	+	–	–

a) *, Single spore isolation; **, Isolates were gifted.
b) A : Nov. 1992 , B : July 1989 , C : July 1992 , D : July 1993 , E : June 1993 , F : July 1988 , G : Nov. 1991.
c) Fa = falcate, Cy = cylindric, Fu = fusiform.
d) Survey was performed 9 days after inoculation with each piece of mycelial block.
e) Each isolate was inoculated twice on the leaves of cv. Shin-ichinose (*Morus alba*).
f) Each isolate was inoculated twice on the leaves of Keguwa (*M. tiliaefolia*).

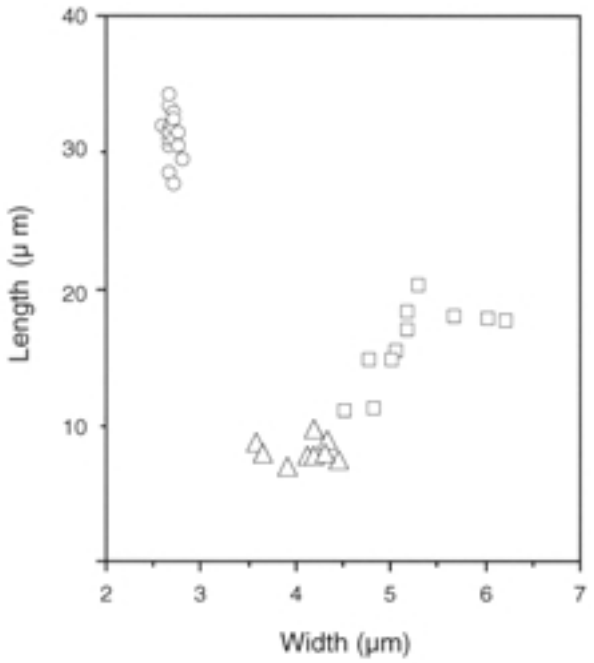

Fig. 2. Average size of conidia in each anthracnose fungus isolated from diseased mulberry leaves. Shape of conidia: ○, falcate; △, cylindric; □, fusiform.

(Penzig) Penzig et Saccardo と同定した．３番目のグループは，分生子の形態が紡錘形（大きさ11.3～17.5 ×3～5 μm）のもの10菌株からなり，これらはArx（1981；1987），小林（1993），Simmonds（1965），Sutton（1980）らによる *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds と同定した．

なお，炭疽病菌３種についてPDA平板培地上での生育状態をFig. 1-3 に示した．*C. dematium* のPDA平板培地上での菌叢は暗黒色から暗緑色で，気中菌糸をあまり形成せず，分生子もほとんど形成しなかった．それに対し，MSA平板培地上での菌叢は暗灰緑色から暗黒色で，分生子（Fig. 1-4）を多数形成した．*G. cingulata* のPDA培地上での菌叢は菌株により異なったが，一般に白色ないし灰白色で気中菌糸を豊富に形成し，内部に鮭肉色の分生子（Fig. 1-5）の粘塊が観察されるものが多かった．*C. acutatum* のPDA培地上での菌叢は淡赤紫色であり，裏面ではより鮮明であった．分生子（Fig. 1-7）粘塊もよく形成した．なお，本菌は気中菌糸を形成するが，菌糸の先端には上述の分生子とは異なる小型分生子が多数観察された．

３．考　察

今回得られた56菌株について同定を行ったところ，*C. dematium*，*G. cingulata*，および*C. acutatum* の３種が新たに同定された．既往の２種の炭疽病菌のうち，*C. morifolium*（原，1925）は分生子が鎌形で大きさ20～24×3～5 μmとあり，今回*C. dematium* と同定した菌群と形態的に酷似する．Table 2 に*C. morifolium* と*C. dematium* との分生子の形態的比較を示したが，*C. morifolium* の形態は諸研究者の記録した*C. dematium* の範囲に入る．*C. morifolium* はその分生子の形態および大きさから*C. dematium* に含めてよいと判断し，以下のように記載することを提案する．

Colletotrichum dematium（Persoon:Fries）Grove

Synonym: *Colletotrichum morifolium* Hara（原，1925）

Colletotrichum dematium f. *morifolium*（Hara）Yamamoto（山本，1960）

また，原(1954)が記載している*C. morina* Haraは，今

Table 2. Comparison of conidial size between *C. dematium* and *C. morifolium*

Species	Conidial size (μm)	Literature
C. dematium	20－30 × 3－5	von Arx (1987)
	19.5－24 × 2－2.5 (3.5)	Sutton (1980)
	22.5－32.5 × 2.5－4	Sasaki (1977)
	20－28.6 × 2.8－3.8	Horie *et al*. (1990)
	22.5－32.5 × 2－3	The authors
C. morifolium	20－24 × 3－5	Hara (1925)

回は分離されなかった．その記載によれば，菌の分生子の大きさは５～７×３～４ μmで，上記３種の炭疽病菌とは全く異なるが，記載や研究が不十分なため，その存在の有無および分類上の位置づけについては，今回検討できなかった．原（1951）は本病菌として*Colletotrichum morifolium*の他に*C. mori*という菌種を記載している．しかし，*C. mori*の分生子の形態等の記載が上述の*C. morina* の記載と良く一致していることから，*C. mori*と*C. morina* は同一種と見なすべきであると判断した．以上のことから，日本におけるクワ炭疽病菌は，① *C. dematium*，② *C. acutatum*，③ *G. cingulata*，④ *C. morina*の４種が存在することが明らかになった．

Ⅳ　クワ炭疽病菌の病原性

全国の罹病クワ葉から分離・同定した３種の炭疽病菌のクワに対する病原性を調べるとともに，病原力の差異について検討した．また，これら３種の炭疽病菌について，クワ以外の植物葉に対する病原性を調べた．さらに，他の宿主由来の炭疽病菌のクワ葉に対する病原性を比較し，分化型（forma specialis）の適用の是非も検討した．

１．クワ葉に対する病原性

(1) 材料および方法

分離菌株の病原性は，切り取ったクワ葉を用いて菌叢片接種法と分生子接種法の２つの方法で調べた．すなわち，菌叢片接種の場合は，当研究所内で栽培されている普及奨励クワ品種「しんいちのせ」（カラヤマグワ，*Morus alba* L.）を用い，各分離菌株のMSA培地上の新鮮な菌叢片（約３～５mm角）を接種源とし，葉の一部に10針で２～３回の刺し傷を付け，そこに菌叢片を置床した（有傷接種）．また，極めて罹病しやすいケグワ（*M. tiliaefolia* Makino）の1系統である「毛桑」も用いたが，この場合は無傷接種とした．接種後は葉を約25℃の湿室に保ち，９日後に発病調査を行った．発病の程度は，形成された病斑の大きさにより４段階に分けて表示した．分生子接種の場合は，供試菌株の分生子懸濁液（約10^6個/ml）に直径８mmの円形ろ紙を浸漬し，分生子を含んだろ紙を直ちに葉の有傷および無傷部に１枚ずつ置床した．接種後は葉を約25℃の湿室に６～９日間保持した後，発病を調査した．

(2) 結　果

ａ　菌叢片接種による病斑形成

「しんいちのせ」および「毛桑」の切り取り葉に対し，得られた３種の分離菌56菌株の病原力を調べ，その程度をTable１に示した．また，供試菌株数に対する病斑形成菌株数の割合（病斑形成率）を，菌種および品種別にまとめてFig.３に示した．病斑形成は供試した炭疽病菌３種の全てで認められた．しかし，３種の病斑形成率を比較すると*C. dematium*および*C. acutatum*では病斑形成率が極めて高いのに対し，*G. cingulata* では低かった（Fig.３）．また，病斑の大きさを見ると*C. dematium* のほとんど および*C. acutatum*の一部の菌株は，大型で顕著な病斑を形成した（Fig.4-1,2）のに対し，*G. cingulata* および大半の*C. acutatum* の菌株は，小型の病斑を形成した．

ｂ　分生子接種による病斑形成

切り取り葉に対する分生子の病原力を調べた．供試菌株は，上述の菌叢片接種試験で比較的病原力の強かった菌株，すなわち*C. dematium*ではS9269，*G. cingulata* ではS9274，*C. acutatum* ではS9307の合計３菌株とし，接種試験は各菌株とも３反復で行った．また，供試したクワは品種「落井」（ログワ，*M. multicaulis* Perr.）である．

有傷接種の場合，*C. dematium*は菌叢片接種と同様に顕著な病斑を形成した（Fig. 4-3）．*G. cingulata*もやや強い病原力を示したのに対し，*C. acutatum*は弱い病原力を示した．また，無傷接種の場合，病斑形成は*C. dematium*および*G. cingulata*で見られたが，*C. acutatum* では見られなかった．

２．各種植物葉に対する病原性

(1) 材料および方法

ａ　供試菌株

供試菌は，クワ罹病葉から分離した*C. dematium*，*C.*

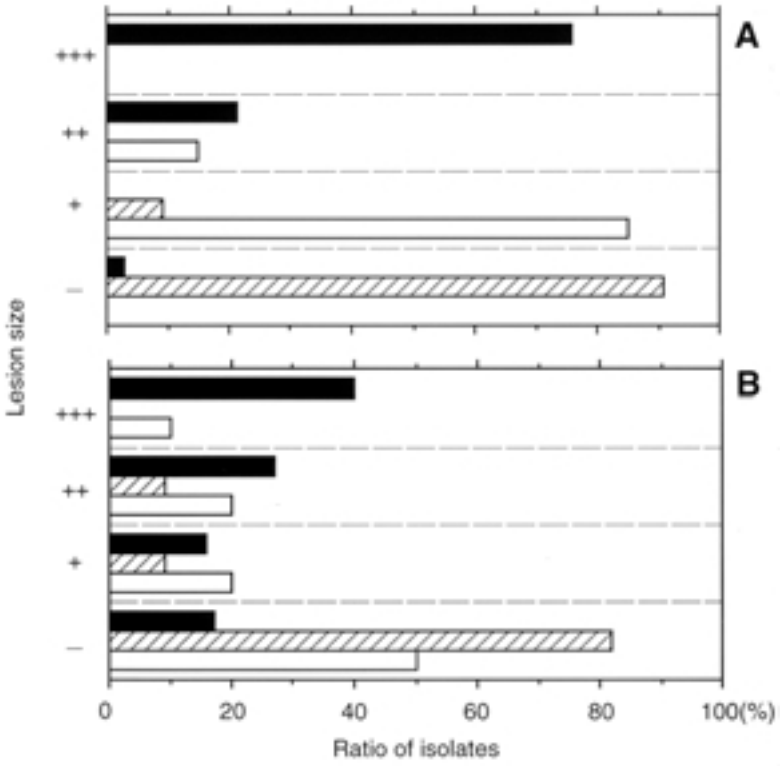

Fig. 3. The ratio of lesion formation on mulberry leaves by anthracnose fungi isolated from mulberry leaves. Mycelial blocks of each fungal isolate were placed at punctured site on the leaves of cv. Shin-ichinose（A）or at intact site on the leaves of Keguwa（B）.
■, *C. dematium* ; ▨, *G. cingulata* ; □, *C. acutatum*.

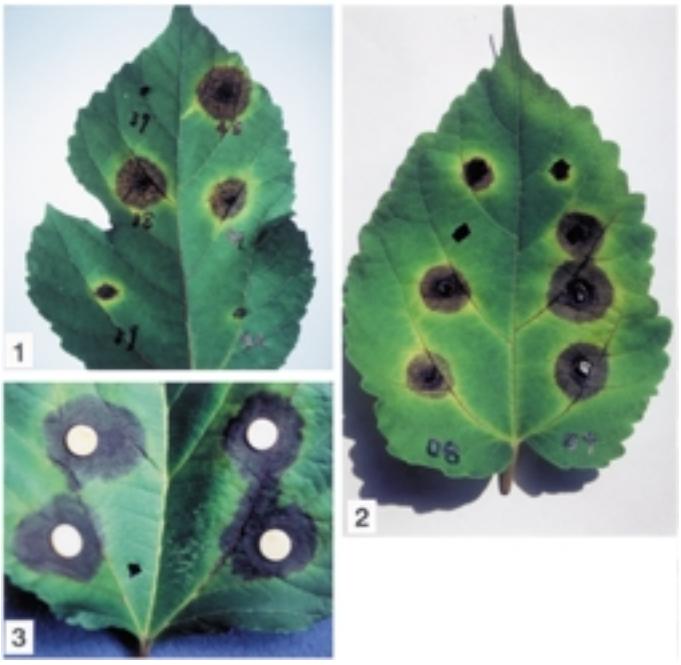

Fig. 4.
-1. Lesion formation on the leaf of Keguwa（*M. tiliaefolia*）inoculated with mycelial blocks of *C. dematium*.
-2. Lesion formation on the leaf of Keguwa inoculated with mycelial block of *C. acutatum*.
-3. Lesion formation on the leaf of cv.Ochii（*M. multicaulis*）inoculated with conidial suspension of *C. dematium*. Filter paper Fp was soaked in conidial suspension of *C. dematium* S9269.

acutatum，*G. cingulata*の３種であり，菌株は*C. dematium*ではS8901，S9269，*C. acutatum*ではS9303，*G. cingulata*ではS9233，S9244，S9274，S9275を用いた．

b　供試植物

供試した植物は，Table ３に示したクワ科植物を含めた21科37種であり，その大半は1993年８月に当研究所周辺から採取したものとした．

c　病原性試験

病原性の検定は，上述と同様にMSAまたはジャガイモ煎汁・スクロース寒天培地（PSA：ジャガイモ 200g，スクロース 20g，寒天 18g，蒸留水 １ℓ）平板上から調製した菌叢片および分生子懸濁液（約10^6個/ml）を，切り取り葉に有傷および無傷接種することにより行った．接種葉は約25℃に設定した湿室内に保持し，７日後に発病を調査した．なお，接種試験は全て２反復で行い，発病（病原力）の程度は形成された病斑の大きさにより，病斑形成が認められる（+），直径15mm以上

Table 3. Plants used for inoculation with mulberry anthracnose fungi [a)]

Japanese name	Scientific name [b)]	Family name [b)]
Kuchinashi	*Gardenia jasminoides* Ellis forma *grandiflora* Makino	Rubiaceae
Toukaede	*Acer buergerium* Miq.	Aceraceae
Kaki	*Dispyros kaki* Thunb.	Ebenaceae
Shirakaba	*Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara	Betulaceae
Keguwa	*Morus tiliaefolia* Makino	Moraceae
Shimaguwa	*Morus acidosa* Griff.	Moraceae
Inubiwa	*Ficus erecta* Thunb.	Moraceae
Ichijiku	*Ficus carica* L.	Moraceae
Oomurasaki	*Rhododendron pulchrum* Sweet	Ericaceae
Yabutsubaki	*Camellia japonica* L.	Theaceae
Harunire	*Ulmus davidiana* Planch. var. *japonica* Nakai	Ulmaceae
Momo	*Prunus persica* Batsch.	Rosaceae
Nashi	*Pyrus serotina* Rehder	Rosaceae
Ringo	*Malus pumila* Mill. var. *dulcissima* Koidz.	Rosaceae
Satozakura	*Prunus donarium* Sieb.	Rosaceae
Ume	*Prunus mume* Sieb. et Zucc.	Rosaceae
Biwa	*Eriobotrya japonica* Lindl.	Rosaceae
Ichigo	*Fragaria chiloensis* Duch. var. *ananassa* Bailey	Rosaceae
Satsumaimo	*Ipomoea batatas* Lam. var. *edulis* Makino	Covolvulaceae
Tsuta	*Parthe nocissus tricuspidata* Planch.	Vitaceae
Kuri	*Castanea crenata* Sieb. st Zucc.	Fagaceae
Matebashii	*Lithocarpus edulis* Nakai	Fagaceae
Shirakashi	*Quercus myrsinaefolia* Blume	Fagaceae
Konara	*Quercus serrata* Thunb.	Fagaceae
Kunugi	*Quercus acutissima* Carruth.	Fagaceae
Kiwifurutsu	*Actinidia chinensis* Planch.	Actinidiaceae
Amerikafuu	*Liquidamber styraciflua* L.	Hamamelidaceae
Unshumikan	*Citrus unshiu* Marcov.	Rutaceae
Hanamizuki	*Cornus florida* L.	Cornaceae
Hakumokuren	*Magnolia denudata* Desr.	Magnoliaceae
Yurinoki	*Liriodendron tulipifera* L.	Magnoliaceae
Kobushi	*Magnolia kobus* DC.	Magnoliaceae
Yamamomo	*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.	Myricaceae
Ajisai	*Hydrangea macrophylla* Seringe var. *otaksa* Makino	Saxifragaceae
Utsugi	*Deutzia crenata* Sieb. et Zucc.	Saxifragaceae
Yuzuriha	*Daphniphyllum macropodum* Miq.	Euphorbiaceae
Ryoubu	*Clethra barbinervis* Sieb. et Zucc	Clethraceae

a) Detached leaves collected on August in 1993 were used for the test.
b) Scientific and family name of each plant was referred to " Makino's illustrated flora in color" (Makino, 1985).

の大型の病斑が形成される（+++），両者の中間（++）の３段階に分けて表示した．

(2) 結　果

ａ　菌叢片接種における病原性

菌叢片を接種源とした場合の各種植物に対する病原性検定の結果をTable４に示した．なお発病程度は，いずれの植物においても反復による差が小さかったため，表中には発病程度の大きい値のみを示した．

有傷接種では，３種の炭疽病菌とも供試した大部分の植物に病原性を示した．特に*G. cingulata*の４菌株はほとんど全ての植物に病原性を示し（Fig. 5-1, 2），病原性を示さなかった植物はクチナシ，ヤブツバキ，クヌギ，ミカンだけであった．*C. acutatum*（S9303）も同様

Table 4. Lesion formation on various detached leaves inoculated with mycelial blocks of mulberry anthracnose fungi

Plants (Japanese name)	Punctured site							Intact site						
	G. c [a]				C. d [b]		C. a [c]	G. c				C. d		C. a
	1	2	3	4	1	2	1	1	2	3	4	1	2	1
Kuchinashi														
Toukaede	+ [d]	+	+	+	+		+							
Kaki	+	+	+	+++	+	+	+++							
Shirakaba	+	++	+++	+++	+	++	+++				+++			
Keguwa	+	++	+++	++	+	+++	+++							
Shimaguwa				+	++	+++	+					+++	++	
Inubiwa		+	+				+							
Ichijiku		+		+	++		+++							
Oomurasaki	+	+	+			+++	+							
Yabutsubaki														
Harunire		+	+		+	+	+							
Momo	+	++	++	*	+		*				*			*
Nashi	++	+++	+++	+++	++	++	+++		+	++				
Ringo	+	+++	+++	+++	+	+++	++		+				+	
Satozakura	+	++	++	+	+	+	+							
Ume	+	+++	+	+++	+	+	+++			+				+++
Biwa	+	+	++	+		+	+							
Ichigo	++	+++	+++	+++			+++		++	+++	++			+++
Satsumaimo		+	+	*			*				*			*
Tsuta	+	+++	+++				+							
Kuri	+	+	+	+			+							
Matebashii		+					+							
Shirakashi			+		+									
Konara		+		+	+									
Kunugi							+							
Kiwifurutsu		+	+	+			++							
Amerikafuu	+	++	++	+			+							
Unshumikan				*			*				*			*
Hanamizuki	+	++	+	+++	++	+	+++		+	+				
Hakumokuren		+	+	+	+		+							
Yurinoki	+	+	++	++	+		++		+			+		
Kobushi		+		+			++							
Yamamomo		+												
Ajisai		+	+				+							
Utsugi		+	++	+						+				
Yuzuriha	+	+	+	+		+	+							
Ryoubu	++	+		+			+++				+			+

a) Isolate No. of *G. cingulata*: 1, S9233; 2, S9244; 3, S9275; 4, S9274.
b) Isolate No. of *C. dematium*: 1, S8901; 2, S9269.
c) Isolate No. of *C. acutatum*: 1, S9303.
d) Size of lesion: +++, large (over 15 mm in diameter); ++, middle; +, small; blank, no lesion; *, Inoculation was not conducted.

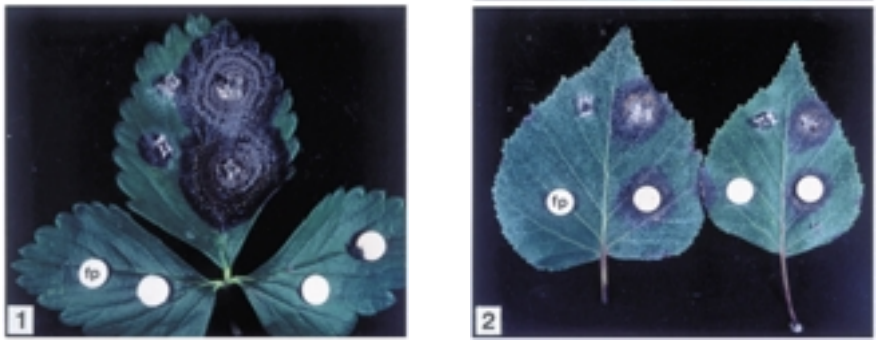

Fig. 5-1. Lesion formation on strawberry leaves inoculated with *G. cingulata* S9244. Inoculation: left leaf, conidial suspension was inoculated at intact site; central leaf, mycelial blocks were inoculated at intact（left side）and at punctured（right side）sites; right leaf, conidial suspension was inoculated at punctured sites. fp= filter paper soaked in conidial suspension.

-2. Lesion formation on Shirakaba（*Betula platyphylla* var. *japonica*）leaves inoculated with *G. cingulata* S9274. Inoculation: upper left side, mycelial block was inoculated at intact site; upper right side, mycelial block was inoculated at punctured site; lower left side, conidial suspension was inoculated at intact site; lower right side, conidial suspension was inoculated at punctured site.

にかなり広い範囲に病原性を示した．*C. dematium*は他の２種と比べやや範囲は限られる傾向が見られたもののクワ科以外にもバラ科植物等に病原性を示した．

無傷接種では，有傷接種に比べ３種の炭疽病菌とも病原性を示した植物の数は極端に減少し，病原力も低下する傾向が見られた．菌種ごとに見ると，*G. cingulata*では有傷接種で比較的幅広い病原性を示した菌株（S9244およびS9275）が，無傷接種ではバラ科植物およびモクレン科植物等の一部の植物にしか病原性を示さなかった．また，*C. dematium*がクワ科植物（「毛桑」）以外に病原性を示した植物は，リンゴ，ユリノキのみであった．*C. acutatum*はウメ，イチゴ，リョウブのみに病原性を示した．

b　分生子接種における病原性

分生子を接種源とした場合の病原性検定の結果をTable５に示した．有傷接種の場合，*G. cingulata*および*C. acutatum*は広範囲の植物に病原性を示した．*C. dematium*が病原性を示した植物は，クワ科植物以外では，リンゴ，サツマイモ，ユリノキ等であり他の２種と比較して少なかった．なお，ユリノキは３種の菌のいずれによっても病斑形成が認められた．無傷接種で病斑を形成した植物の種類は，菌叢片接種の場合と同様に３種の供試菌いずれにおいても減少し，特に*C. acutatum*はイチゴにのみ病原性を示した．ユリノキは*G. cingulata*および*C. dematium*によって大型の病斑が形成され，クワ科植物は*C. dematium*のみによって顕著な病斑が形成された．

３．他宿主由来の炭疽病菌との病原性の比較

（1）材料および方法

a　供試菌株

クワを含めテンサイ，チャ等15種類の宿主から分離した炭疽病菌５種，26菌株を供試した．供試各菌株の種名，菌株名，分離源の植物名をTable６に示した．

b　供試植物

接種試験には当研究所内で栽培されたクワ品種「しんいちのせ」，「落井」および「毛桑」の３種を用い，いずれも健全葉を切り取って供試した．また，*C. dematium*の病原性に関する比較試験では，各菌株の分離源となった宿主植物としてブナ（森林総合研究所から分譲，受入番号93-037），ビート（「デトロイトダークレッド」，タキイ），ホウレンソウ（品種名不明）を用い，ポットおよびプランター植えの植物体の若葉を，切り取らずに供試した．

c　病原性試験

各菌株の接種源は，上述と同様にMSAおよびPSAの平板上から調製した菌叢片および分生子懸濁液（約10^6個/ml）の２種類とし，これらを各切り取り葉に有傷お

Table 5. Lesion formation on various detached leaves inoculated with conidial suspension of mulberry anthracnose fungi

Plants (Japanese name)	Punctured site							Intact site						
	G. c [a]				C. d [b]		C. a [c]	G. c				C. d		C. a
	1	2	3	4	1	2	1	1	2	3	4	1	2	1
Kuchinashi														
Toukaede		+	+	+			+			+				
Kaki				+			+							
Shirakaba	+[d]	+	++	+	+		++							
Keguwa	+	+		+	++	++	+			++		+++	++	
Shimaguwa			+++		+++	+++						+++	+++	
Inubiwa			+											
Ichijiku		+			+		++							
Oomurasaki			+											
Yabutsubaki														
Harunire										++				
Momo		+	+	*			*			+	*			*
Nashi		++	++	+			+++		++					
Ringo		+	++			+	+							
Satozakura			+											
Ume		+	+	++	+		+++							
Biwa														
Ichigo		+	+++	+			++			+				+
Satsumaimo				*		+	*				*		+	*
Tsuta	+	++	++	+							+			
Kuri		+												
Matebashii														
Shirakashi			+											
Konara														
Kunugi														
Kiwifurutsu							+							
Amerikafuu		+	+											
Unshumikan				*			*				*			*
Hanamizuki				+++			+++							
Hakumokuren		+		+			+							
Yurinoki		+	+	++	++	+++	++		+++	++	++	++		
Kobushi		+					++							
Yamamomo		+												
Ajisai			+											
Utsugi			++											
Yuzuriha			+											
Ryoubu		+												+

a) Isolate No. of *G. cingulata*: 1, S9233; 2, S9244; 3, S9275; 4, S9274.
b) Isolate No. of *C. dematium*: 1, S8901; 2, S9269.
c) Isolate No. of *C. acutatum*: 1, S9303.
d) Size of lesion: +++, large (over 15 mm in diameter); ++, middle; +, small; blank, no lesion; *, Inoculation was not conducted.

よび無傷接種した．分生子を形成しない菌株では菌叢片のみを接種源として用いた．なお，接種は菌叢片ではPSAおよびMSA培地で生育させたものそれぞれ２反復の計４反復，分生子懸濁液では２反復行った．接種後は，供試植物を約25℃の湿室内で保持し，４～９日後に病原性の検定を行った．検定は病斑形成の有無により行い，さらに病斑の大きさにより病原性の程度を本章の２と同様に３段階に区分した．

(2) 結　果

ａ　クワに対する供試菌の病原性

供試した各種炭疽病菌について３種のクワに対する病原性の検定結果をTable７，８に示した．なお，菌叢片接種による病斑形成では培地の種類による影響がな

Table 6. Anthracnose fungi used for inoculation to mulberry leaves

Species	Isolate No.[a)]	Host (Organ)
C. dematium	S9269	Mulberry (Leaf)
	S8901	Mulberry (Leaf)
	*MAFF305982	Passion fruit (Stem)
	*C-4b106	Beech (Seedling)
C. dematium f. sp. *spinaciae*	*Cs-5M	Sugar beet (Leaf)
	*Cs-22M	Sugar beet (Seed)
G. cingulata	S9233	Mulberry (Leaf)
	S9244	Mulberry (Leaf)
	S9275	Mulberry (Leaf)
	*31B21	Tea
	*911003-1	Apple (Fruit)
	*Tu9101	Strawberry (Crown)
	*NM-1	Strawberry (Crown)
	*MAFF305142	Grape
	*MAFF305791	Star fruits (Fruit)
C. gloeosporioides	*911001-2	Persimmon (Fruit)
	*910409-1	Orange (Leaf)
	*MAFF305594	Mango
	*MAFF305596	Japanese medlar
	*MAFF305750	Passion fruit (Stem)
	*MAFF305787	Papaya (Fruit)
	*MAFF306011	Mulberry (Leaf)
C. acutatum	S9303	Mulberry (Leaf)
	*MAFF306282	Strawberry (Leaf)
	*No91-017	Strawberry (Leaf)
	*MAFF306247	Pralrie gentian (Stem)

a) *, Isolates were gifted. Isolates of MAFF accession number are preserved in National Institute of Agrobiological Resources.

いと判断されたため表中には４反復のうち中間の２つの値を示した．

菌叢片を接種した場合（Table７），有傷接種では，ほとんどの菌株がクワに病斑を形成した．すなわち，「毛桑」にはブドウ由来の菌株*G. cingulata*（MAFF305142），ミカン由来の菌株*C. gloeosporioides*（910409-1），シマグワ由来の菌株*C. gloeosporioides*（MAFF306011）を除く全ての菌株が病斑を形成した．「落井」に対しても，ほとんどの菌株が病斑を形成した．しかし「しんいちのせ」に対しては，クワ由来の菌株を含め８菌株しか病斑を形成しなかった．また，病原力は，「毛桑」では菌株間の差があまり見られず，いずれの菌株も大型の病斑を形成した（Fig. 6-1）．「落井」では，クワ，テンサイ，イチゴ，トルコギキョウ由来の菌株で顕著な病斑を形成した．無傷接種では，いずれのクワに対しても病斑を形成した菌株はわずかであり，*C. acutatum*であるS9303，No91-017，MAFF306242の３菌株のみが「毛桑」または「落井」に対して病斑を形成した．

分生子懸濁液を接種源とした場合（Table８），有傷・無傷接種の両方でクワ由来の*C. dematium*（S8901およびS9269）が，特に強い病原力を示した（Fig. 6-2）．すなわち，有傷接種において「毛桑」に病原性を示した上記以外の菌株はブナ由来の*C. dematium*（C-4b106），テンサイ由来の*C. dematium* f. sp. *spinaciae*（Cs-5M，Cs-22M），シマグワ由来の*C. gloeosporioides*（MAFF306011），クワ由来の*C. acutatum*（S9303），トルコギキョウ由来の*C. acutatum*（MAFF306242）のみであった．「しんいちのせ」では*C. acutatum*（S9303）が，

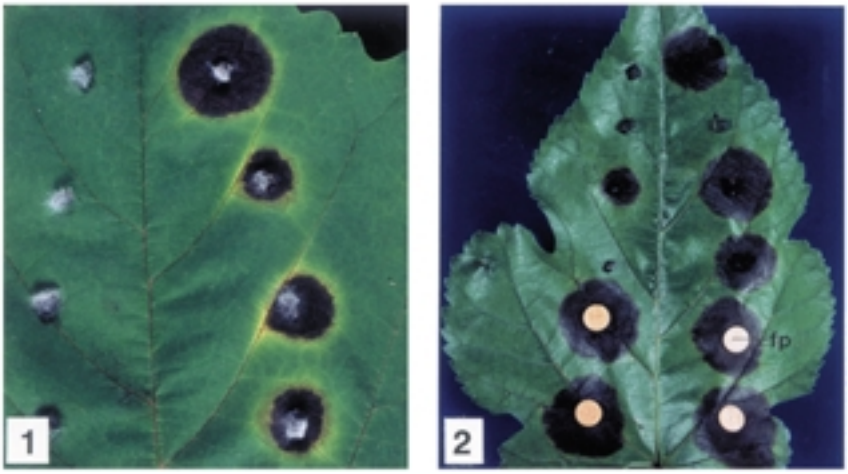

Fig. 6.-1. Lesion formation at punctured sites（right side）of Keguwa leaves inoculated with mycelial blocks of *G. cingulata* NM-1 isolated from strawberry crown. Left side: mycelial blocks were inoculated at intact sites.
-2. Lesion formation on mulberry leaf of cv. Shin-ichinose inoculated with *C. dematium* S8901 isolated from mulberry leaves. Inoculation: upper left side, mycelial blocks were inoculated at intact sites; upper right side, mycelial blocks were inoculated at punctured sites; lower left side, conidial suspension was inoculated at intact sites; lower right side, conidial suspension was inoculated at punctured sites. fp= filter paper soaked in conidial suspension of *C. dematium*.

「落井」ではミカン由来の*C. gloeosporioides*（910409-1）のみが病原性を示した．また，無傷接種においては，クワ由来の*C. dematium*の２菌株のみがクワに対して病原性を示した．

b　クワおよび他の宿主植物から分離した*C. dematium*の病原性比較

クワ葉に最も強い病原力を示した*C. dematium*の病原性について詳細な検討を行うために，他の宿主から分離した*C. dematium*および*C. dematium* f. sp. *spinaciae*の各分離源植物に対する病原性の比較試験を行った．すなわちクワ由来（S8901，S9269），ブナ由来（C-4b106）の*C. dematium*およびテンサイ由来の*C. dematium* f. sp. *spinaciae*（Cs-22M，Cs-5M）の合計５菌株を，クワ（「毛桑」，「落井」），ブナ，ビート，ホウレンソウの葉それぞれに，上記と同様の方法で接種し，クワでは６日，ブナでは７日，アカザ科植物では５日後に病原性を調査した．なお，今回の試験ではテンサイを供試できなかったため，同じアカザ科植物であるビート，ホウレンソウで代用した．また，クダモノトケイソウ由来の菌株（MAFF305982）については，欠調とした．

その結果，菌叢片を接種源とした場合には有傷接種と無傷接種では病徴の発現が異なり，前者では明らかに強い病原力を示したが，後者ではほとんど病徴が見られなかった（Table ９）．有傷接種では，それぞれの分離源に対応する各菌株で病原性が認められ，さらに両者が対応しない場合でも病原性が認められた．また，クワには，クワ由来のS8901株，S9269株およびテンサイ由来のCs-22M株が強い病原力を示した．

一方，分生子懸濁液を接種した場合には（Table 10），菌叢片の接種と比較して，供試菌株と宿主植物との関係がより明瞭に示された．特に，クワから分離されたS8901株およびS9269株はクワに強い病原力を示し，無傷接種においても顕著な病斑を形成した．また，ブナ由来およびテンサイ由来の各菌株は「毛桑」に対して有傷接種で病原性を示した．

４．考　察

分離した炭疽病菌３種のクワ葉に対する病原性を調べた結果，３種とも病原性を有することが明らかになった．特に，*C. dematium*は菌叢片および分生子の接

Table 7. Lesion formation on mulberry leaves inoculated with mycelial block of anthracnose fungi

Species	Isolate No.	Punctured site			Intact site		
		K[a]	S	O	K	S	O
C. dematium	S9269	●●[b]	●◎	●●	−−	−−	−−
	S8901	●●	◎◎	●●	−−	−−	−−
	MAFF305982	◎○	−−	○○	−−	−−	−−
	C-4b106	●−	−−	−−	−−		−−
C. dematium f. sp. *spinaciae*	Cs-5M	●●	−−	●●	−−	−−	−−
	Cs-22M	●●	−−	●●	−−	−−	−−
G. cingulata	S9233	◎○	−−	−−	−−	−−	−−
	S9244	●◎	−−	−−	−−	−−	−−
	S9275	○○	−−	●●	−−	−−	−−
	31B21	●◎	−−	−−	−−	−−	−−
	911003-1	●◎	−−	−−	−−	−−	−−
	Tu9101	◎○	−−	◎−	−−	−−	−−
	NM-1	●●	●◎	●●	−−	−−	−−
	MAFF305142	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305791	○○	−−	−−	−−	−−	−−
C. gloeosporioides	911001-2	○○		◎○	−−		−−
	910409-1	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305594	○○	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305596	●◎	○○	●−	−−	−−	−−
	MAFF305750	●◎	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305787	●●	−−	●○	−−	−−	−−
	MAFF306011	−−	−−	○−	−−	−−	−−
C. acutatum	S9303	●●	○○	○○	●−	−−	−−
	MAFF306282	●●	○○	◎○	−−	−−	−−
	No91-017	●●	○○	◎○	−−	−−	◎−
	MAFF306247	●●	◎○	●●	●−	−−	−−

a) Mulberry cultivar: K, Keguwa; S, Shin-ichinose; O, Ochii.
b) Size of lesion: ●, large (over 15 mm in diameter); ◎, middle; ○, small; −, no lesion.

種で，強い病原力を示した．また，採集した都道府県は限られるが，前章で示したように本菌はほぼ全国的に分布していた．これらのことから*C. dematium*は，通常の栽培環境下で見られる炭疽病の主たる病原菌であると考えられる．一方，*G. cingulata*および*C. acutatum*は病原性を有するものの，その病原力は*C. dematium*に比べて弱く，菌株による差も大きかった．このことから，これら２種はクワの生理状態に大きく依存するとも考えられ，それらの菌に起因する本病発生は少ないことが考えられる．

本来，上記３種の炭疽病菌はいずれも幅広い宿主範囲を持ち，多犯性であることが知られている．既報によると*C. dematium*は，ブナ，ワタ，ユリ，ハラン等を加害し（小林，1993），その他の報告からはマメ類（Lenne, 1992），イチゴ，トマト，タマネギ（Baxter *et al.*，1983）等にも被害を及ぼすことが知られている．*G. cingulata*は*C. gloeosporioides*の完全世代名として知られ，ブドウ晩腐病等極めて多くの植物に炭疽病を引き起こすとされている（佐藤，1993；池上，1984a）．また，1965年に新種として記載された*C. acutatum*についても，イチゴのほか多くの植物を加害することが知られている（Dyko and Mordue，1979；Baxter *et al.*，1983）．このようにこれら３種の菌は広い宿主範囲を持つことから，クワから分離された菌株も同様に幅広い宿主範囲を持つことが推察された．一方，*C. morifolium*はクワのみに寄生するとの記載（高橋，1988）があり，宿主範囲につ

Table 8. Lesion formation on mulberry leaves inoculated with conidial suspension of anthracnose fungi

Species	Isolate No.	Punctured site			Intact site		
		K[a]	S	O	K	S	O
C. dematium	S9269	●◎[b]	●○	●●	●●	●●	●●
	S8901	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	MAFF305982	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	C-4b106	●−		−−	−−		−−
C. dematium f. sp. *spinaciae*	Cs-5M	○−	−−	−−	−−	−−	−−
	Cs-22M	●●	−−	−−	−−	−−	−−
G. cingulata	S9233	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	S9244	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	S9275	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305142	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305791	−−	−−	−−	−−	−−	−−
C. gloeosporioides	910409-1	−−	−−	○−	−−	−−	−−
	MAFF305596	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF305750	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF306011	◎−	−−	−−	−−	−−	−−
C. acutatum	S9303	●◎	○−	−−	−−	−−	−−
	MAFF306282	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	No91-017	−−	−−	−−	−−	−−	−−
	MAFF306247	●◎	−−	−−	−−	−−	−−

a) Mulberry cultivar: K, Keguwa; S, Shin-ichinose; O, Ochii.
b) Size of lesion: ●, large (over 15 mm in diameter); ◎, middle; ○, small; −, no lesion.

いて詳しい検討が必要であった．

21科37種の植物の切り取り葉に対する３種の菌の病原性を調べた結果，供試した３種の炭疽病菌はいずれもクワ以外のさまざまな植物に感染しうるものと考えられた．特に*G. cingulata*および*C. acutatum*は，程度の差はあるものの37種類の供試植物のほとんど全てに病原性を示した．この傾向は，これまで知られてきた*G. cingulata*および*C. acutatum*の宿主範囲の広さと一致している．また，クワの主たる病原菌である*C. dematium*は，上記２種と比較して数は少ないものの，バラ科植物等のクワ科以外の植物にも病原性を示した．このことは，本菌が必ずしもクワ特有の病原菌ではなく，*C. morifolium*を*C. dematium*の異名と判断したことを支持している．次に接種方法別に病斑形成程度を比較すると，各植物葉において有傷接種の方が無傷接種より病斑を形成しやすいことが明らかとなった．このことは，植物葉の表面が傷等の障害を持たない場合では，比較的強い抵抗性を示すことを意味している．さらに，付傷によって植物体から溢出した成分が病原菌に作用して病原力を高めること，あるいは，病原菌の生産する病原因子が植物体内に浸透しやすくなるという可能性も考えられる．接種源は，分生子より菌叢片を用いた場合に強い病原力を示す傾向が見られた．この傾向は無傷接種ではあまり明瞭でないが，有傷接種ではいずれの供試菌株でも顕著であった．こうした結果は，菌叢片接種では菌叢とともに切り出した培地からしばらくの間養分が供給されるため，毒素等の病原性因子をより多く生産でき，それらが傷口から植物体内に浸透しやすくなるためであることが一因として考えられる．

クワと他の宿主由来の炭疽病菌を用い，クワの切り取り葉に対する病原性について比較試験を行った結果では，菌叢片の有傷接種では大半の菌株が供試したクワ，特に「毛桑」および「落井」に対して病原性を示した．奥（1993）は病原性を① 宿主に侵入する性質，②宿主の抵抗性に打ち勝つ性質，③ 発病させる性質に分けられるとしている．この場合の①と②は，病原菌

Table 9. Lesion formation on each plant leaves inoculated with mycelial blocks of *C. dematium*（f. sp. *spinaciae*）

Plant [a]	Punctured site					Intact site				
	S8901	S9269	C-4b106	Cs-22M	Cs-5M	S8901	S9269	C-4b106	Cs-22M	Cs-5M
Mulberry (Keguwa)	●● [b]	●●	●−	●●	◎◎	−−	−−	−−	−−	−−
Mulberry (Ochii)	●●	●●	−−	●●	●◎	−−	−−	−−	−−	−−
Beech	○−	◎◎	◎◎	○○	◎◎	−−	−−	−−	−−	−−
Beet	○−	◎◎	◎◎	◎◎	●●	−−	−−	−−	−−	○−
Spinach	○○	○−	○−	◎◎	◎◎	−−	−−	−−	−−	−−

a) Undetached leaves of each plant except mulberry were used.
b) Size of lesion: ●, large (over 15 mm in diameter); ◎, middle; ○, small; −, no lesion.

Table 10. Lesion formation on each plant leaves inoculated with conidial suspension of *C. dematium*（f. sp. *spinaciae*）

Plant [a]	Punctured site					Intact site				
	S8901	S9269	C-4b106	Cs-22M	Cs-5M	S8901	S9269	C-4b106	Cs-22M	Cs-5M
Mulberry (Keguwa)	●● [b]	●●	●−	●◎	○−	●●	●●	−−	−−	−−
Mulberry (Ochii)	●●	●○	−−	−−	−−	●●	●●	−−	−−	−−
Beech	−−	◎◎	○○	○−	−−	−−	−−	−−	−−	−−
Beet	−−	−−	◎◎	−−	○−	−−	−−	−−	−−	−−
Spinach	−−	−−	−−	◎◎	◎◎	−−	−−	−−	−−	−−

a) Undetached leaves of each plant except mulberry were used.
b) Size of lesion: ●, large (over 15 mm in diameter); ◎, middle; ○, small; −, no lesion.

が宿主植物に侵入して栄養をとり，またはその内部に定着するまでの段階に発揮される力としている．すなわち，今回用いた菌叢片の有傷接種では菌叢片に培地が付着しているため，菌が侵入して栄養を得る能力については不明である．また，付着した培地から養分をとった菌が接種部で毒素を生産していた場合には，その影響も無視できない．

このことからも，自然界あるいは通常の栽培状況下で問題とされる厳密な意味での病原性を考えた場合，通常の伝搬源となる分生子等を用いた接種試験により判定するのがより適当であると推察される．各種宿主由来の炭疽病菌の分生子懸濁液をクワに接種したところ，有傷接種における病原性は，クワ由来の*C. dematium*等わずか４種９菌株でしか認められなかった．さらに無傷接種の場合になると，明瞭な病原性を示したものはクワ由来の*C. dematium*の２菌株のみであった．また，菌叢片を接種した場合には，クワ以外の宿主に由来した炭疽病菌も病原性を示したが，最も強い病原性を示したのはクワ由来の*C. dematium*であった．これらのことから，通常の栽培条件下における本病の発生は，大部分がクワ由来の菌によるものと考えられる．

このように，クワ由来の*C. dematium*はクワに対して強い病原力を示した．病原菌と宿主の間に特異的な寄生関係が見られる場合，病原菌の学名には分化型（forma specialis）を付けるのが慣例である．そこでクワ由来の*C. dematium*にこうした分化型を取り入れる可能性を検討するため，クワとブナ由来の*C. dematium*およびその分化型とされるテンサイ由来の*C. dematium* f. sp. *spinaciae*（築尾，1990）を用い，これらの菌株の分離源となった植物それぞれに対して接種試験を行った．菌叢片の接種では，供試菌株と供試植物間で特異的な寄生関係は見られなかったが，分生子懸濁液の無傷接種では，クワ由来の菌株によってのみクワでの病斑形成が認められた．このようにクワ由来の菌株とクワとの間で顕著な親和性が認められたことから，クワ由来の*C. dematium*に分化型を取り入れて良いとも考えられる．しかし，クワ由来の*C. dematium*を各種植物に接種した結果において，分生子懸濁液を有傷接種した場合，数は少ないもののクワ以外の植物にも病原性を示したこと，また，強い病原力を示す他の植物が存在する可能性も残され

ていること，各種植物由来の*C. dematium*の菌株の中にもクワに強い病原性を示すものが存在する可能性があること，さらに，分化型を採用するには，圃場あるいは各種条件下での発病を詳細に比較する必要があること，等の理由から，分化型の導入は慎重にすべきであろう．

Ⅴ　クワ炭疽病菌*C. dematium*に対するクワ品種間の感受性の差異

主たるクワ炭疽病菌である*C. dematium*に対する抵抗性クワ品種の探索・育成は，本病発生の抑止に重要な役割を担っている．そこで本章では，当研究所内の260品種（系統）について，本菌に対する感受性の差異を複数の菌株を用いて調べ，感受性および抵抗性品種の検索を行った．さらに，新たな抵抗性品種育成のための一助として，本菌に対する複数の新系統の実生苗の感受性を調べ，さらに，実生苗の感受性検定用植物としての有効性についても考察を行った．

１．260品種間における感受性の差異

（1）材料および方法

ａ　供試クワ品種および供試葉

供試したクワ品種は当研究所内の桑品種保存園に栽培されている260品種（片桐・小林，1992）を用い，各品種の最長枝条に着生する最大光葉付近の健全葉を，1993年６月に採集して試験に用いた．また，葉令と感受性との関連を調べる試験では，1992年８月に採取した260品種の若葉（先端から約10cmの位置に着生）と成葉（先端から約１ｍの位置に着生）を供試した．

ｂ　供試菌株

供試菌株は，茨城・岩手・熊本の各県の罹病クワ葉から分離された*C. dematium* ３菌株（S8901・S9231・S9269）を用いた．

ｃ　病原性試験

接種源は，前述と同様にMSAの平板上から調製した各菌株の分生子懸濁液（約10^6個/ml）とし，いずれも同様の方法で有傷および無傷接種した．なお，葉令と感受性との関係の試験では有傷接種のみとした．接種後は葉を約25℃の湿室内に入れ，７日間保持した．また，感受性の判定は，保持後葉に出現した病斑の大きさを数値化することによって行った．病斑形成が認められない場合を０，病斑の直径が８mm未満を１，８～15mmを２，16～25mmを３，25mm以上を４とした．なお，数値はクワ260品種を比較した試験では２反復の平均値を用い，葉令と感受性に関する試験では，４反復の平均値を用いた．

（2）結　果

ａ　感受性の品種間差異

C. dematium ３菌株接種により特に大きな病斑を形成した品種をTable 11に示した．３菌株に対し有傷・無傷接種に関わらず特に大きな病斑形成が見られたものは，「唐桑２号」，「東谷」，「長沙」，「彦次郎」，「富陽桑」，「竜川秋雨」等であった．全ての菌株に対してほとんど病斑を形成しなかった品種は「岩瀬」，「大早生」，「群馬赤木」および「大和早生」等であった．また，各供試菌株ごとの病斑形成品種数を，その程度別に分けて調べた結果，各形成程度における品種数は，いずれの菌株ともほぼ同様の割合を示し，無傷に比べ有傷接種でより大きい病斑を形成する傾向が認められた（Fig.７）．各品種における菌株間での病原性の明瞭な差異はほとんど見られなかった．

クワ品種の倍数性の違いによる感受性差異を調べた．供試した260品種を２倍性品種（203品種），３倍性品種（55品種）に分け，それぞれの病斑形成程度を比較した．最も激しい褐変程度を示した品種の占める割合は，２倍性品種のほうが３倍性品種に比べ大きく，この傾向は，有傷，無傷および供試菌株別で比較しても同様であった（Fig.８）．

また，供試したクワ品種を主要な３系統，ヤマグワ系（*M. bombycis*，82品種），カラヤマグワ系（*M. alba*，62品種），ログワ系（*M. multicaulis*，104品種）別に区分し，系統間で病斑形成を比較した．３系統間で顕著な差は認められなかったが，カラヤマグワ系で多少病斑を形成しやすい傾向が認められた（Fig.９）．

Table 11. Mulberry cultivars formed large lesions on the leaves by inoculation with conidial suspension of *C. dematium* isolates [a)]

Site of inoculation	Isolate No. of *C. dematium*		
	S8901	S9231	S9269
Punctured	Shimanouchi Takedajyuumonnji Tousou2gou Fuyousou-Tomi Homare Large Kairyouru- Shizenseirosou Jinguwa Seijyuurou Chijimiguwa Chousa Tsushimayamaguwa Tokiyutaka Naganuma Higashidani Fukayuki Ryuusenushuu Rohachi Wasemidori Jimosutoki	Isebudou Kataneo Kanrasou Kokuka Tousou2gou Hikojirou Hojyumaru Maruhawase Ochii Shimanouchi Shinsou2gou Seijyuurou Chousa Tsurugisansou Nakazawa Hayatesakari Higashidani Fuyousou-Tomi Beikoku13gou Large Jimosutoki	Kanrasou Shironezumigaeshi Dateakagi Hamakawawase Kanadasansou B Kumonryuu Shiratama Shiroshita Jinza Seijyuurou Tsuruguwa Higashidani Rosou Wasemidori Shinzanishiki
Intact	Kokuka Chijimiguwa Tousou2gou Higashidani Homare Tanakaoushuu Chousa Tsushimayamaguwa Hayatesakari Hojyumaru	Atsubamidori Kanrasou Tsuruta Tousou2gou Tosawase Fuyousou-Tomi Hojyumaru Akamerosou Chousa Tsushimayamaguwa Tsurugisansou Naganuma Hayatesakari Hikojirou Beikoku13gou	Asayuki Shironezumigaeshi Tsuruguwa Fuyousou-Tomi Beikoku13gou Homare Ryuusenushuu

a) Cultivars produced 4.0-3.8 in size of lesion were listed.

b　葉令と感受性程度の関係

供試した260品種の成葉および若葉における病斑形成の差異を検討した結果，「改良鼠返」および「鶴桑」等の数種を除いた多くの品種で，成葉と比較して，若葉で大きい病斑を形成した（Fig. 10）.

2．育成系統実生苗における感受性の差異

(1) 材料および方法

a　供試系統

供試したクワは，当研究所の桑育種研究室で育成中の実生47系統であり，その交配親をTable 12に示した．これらの実生を，市販の培養土を入れた約25cm^{3}のプラスチックポットに1個ずつ播種し，温室内で芽出し後，

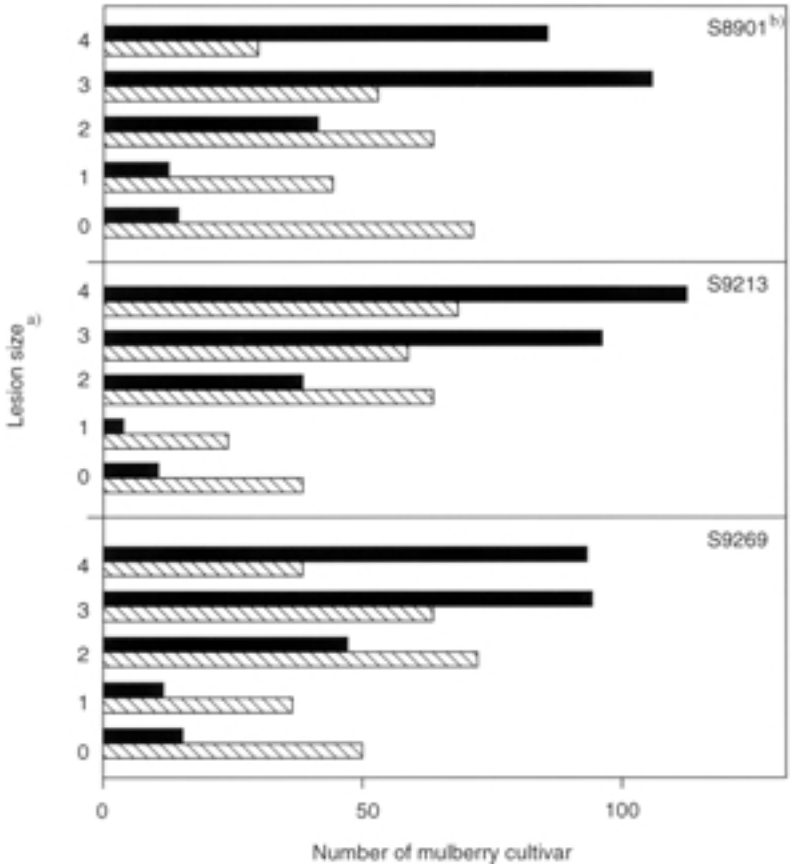

Fig. 7. Number of mulberry cultivars formed each size of lesions on the leaves by the inoculation with *C. dematium*. a) Diameter of lesion: 0, no lesion; 1, below 7 mm; 2, 8-15 mm; 3, 16-25 mm; 4, over 26 mm. b) Isolate number of *C. dematium*. Conidial suspension was inoculated at punctured (■) or intact (▨) sites of the leaves.

約１ヵ月間育成・管理し，本葉が４～８枚展開した苗を，１回の試験につき各品種それぞれ２ポットずつ試験に用いた．

ｂ　病原菌の接種

供試した炭疽病菌は*C. dematium* S8901株とし，上述と同様に分生子懸濁液（５×10^5個/ml）を調製した．接種は，上記懸濁液を各実生苗全面に筆で塗布することにより行い，接種後は苗を約25℃の湿室内で３～４日保持し，その後室内で管理し，６日後に発病を調査した．

ｃ　発病調査

感受性の判定は，苗の本葉にしめる発病葉の割合を算出することによって行った．供試した各系統の２ポットの苗において病斑形成が認められる葉の割合をそれぞれ算出し，それらの平均値をその系統苗の感受性の程度とした．

(2) 結　果

ａ　実生苗系統における感受性の差異

各実生苗系統に対する病斑形成の程度をTable 12に示した．各系統によりその程度は様々であったが，雄親にタイ原産の品種「ノイ」が交配されている系統（系統番号４，11，12，23，25）で大きな病斑を形成する傾向が見られた．一方，病斑形成程度が小さいものは，系統番号９，13，28，30等であり，交配親に４倍体の品種が含まれる系統で多く見られた．

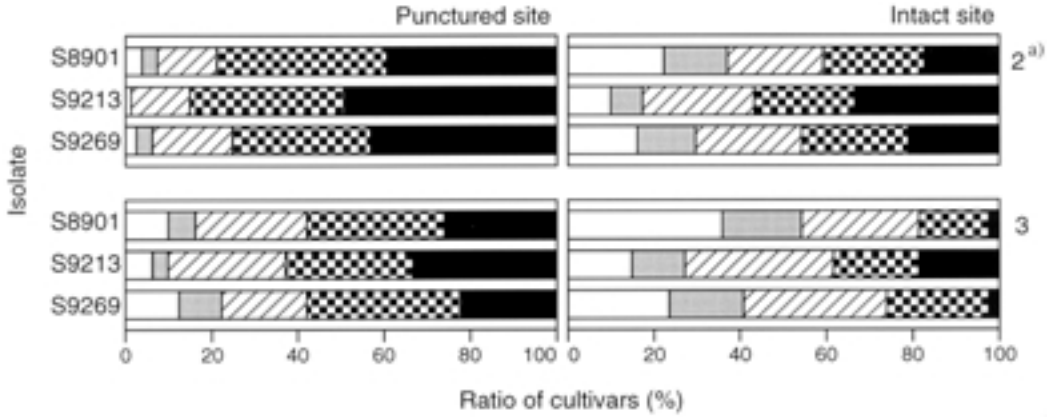

Fig. 8. Ratio of mulberry cultivars in each ploidy formed each size of lesion on the leaves by 3 isolates of *C. dematium*.
a）Ploidy of mulberry: 2, diploid cultivar; 3, triploid cultivar. 203 diploid and 55 triploid cultivars were used for the experiment. Diameter of lesion: □, no lesion; ▭, below 7 mm; ▨, 8-15 mm; ▩, 16-25 mm; ■, over 26 mm.

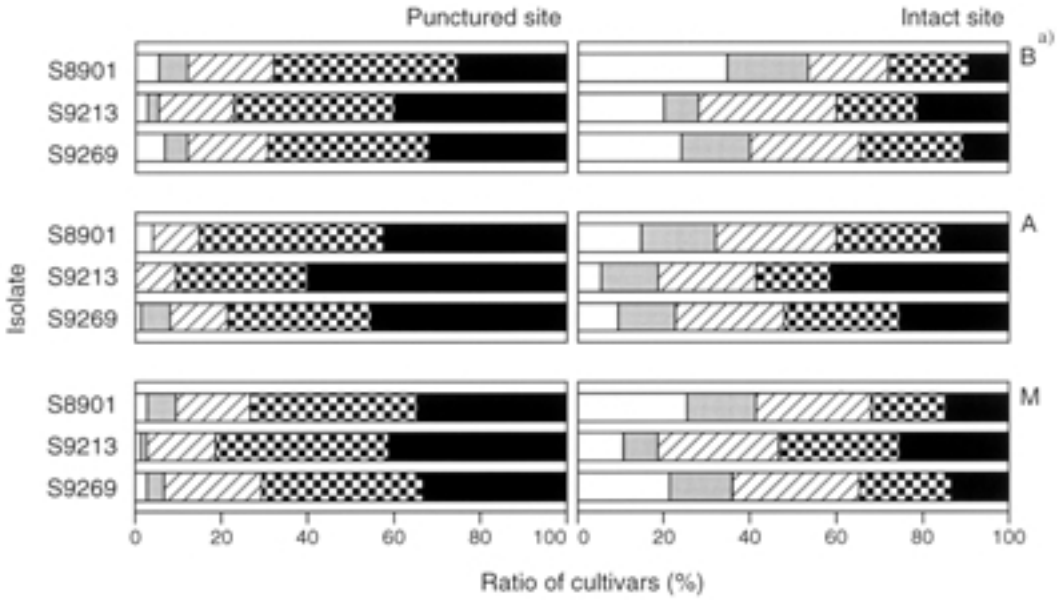

Fig. 9. Ratio of mulberry cultivars in each species formed each size of lesion on the leaves by 3 isolates of *C. dematium*.
a）Species of mulberry: B, *Morus bombycis*; A, *M. alba*; M, *M. multicaulis*. The number of cultivars of B, A, and M are 82, 62, and 104, respectively. Diameter of lesion: □, no lesion; ▭, below 7mm; ▨, 8-15 mm; ▩, 16-25 mm; ■, over 26 mm.

b　実生苗から育成した系統の成葉に対する感受性

感受性または抵抗性が高い系統を選抜して，それらの苗の育成後に得られた成葉に対する本菌の病斑形成について検討した．感受性系統として系統番号４，12，抵抗性系統として９，13，を選び，約4カ月間温室内で育成して，それらの本葉が10～15枚展開した植物体を用いた．これらのうち上位から４～５番目に着生する成葉１枚を採取し，実験に供試した．接種は，上述のように作成した本菌の分生子懸濁液（２×10^6個/ml）10 μlおよび菌叢片を葉面の有傷部に滴下および置床することで行った．接種後は，約25℃の湿室内で７日間保持した後，病斑形成を調査した．また，温室内で育成した「ノイ」の成葉も同様に供試した．

その結果，分生子懸濁液接種の場合，病斑形成は系

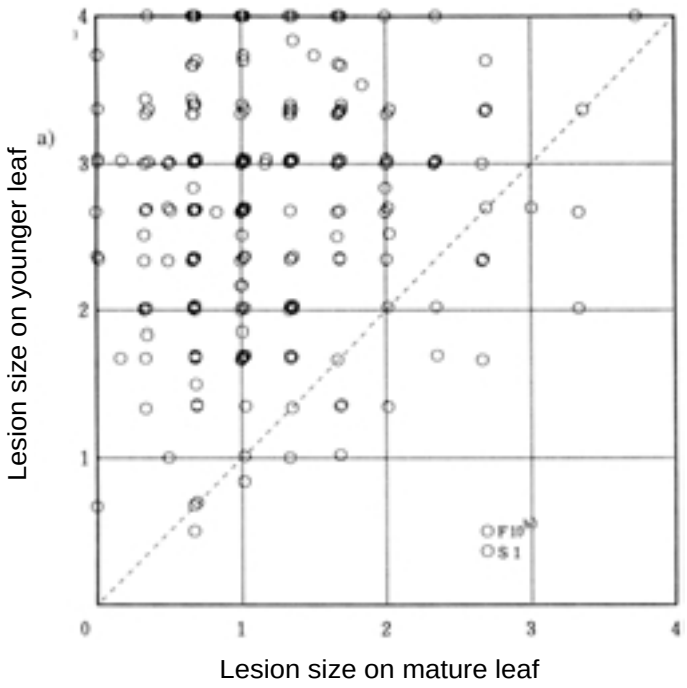

Fig. 10. Difference of lesion size between on young and on mature leaves of each mulberry cultivar formed by *C. dematium*. Conidial suspension was inoculated at punctured site of each leaf. a) Diameter of lesion: 0, no lesion; 1, below 7 mm; 2, 8-15 mm; 3, 16-25 mm; 4, over 26 mm. b) Mulberry cultivar: F10, "Kairyou-nezumigaeshi"; S1, "Tsuruguwa".

統番号４の葉で顕著に見られ，感受性系統12および「ノイ」の葉でも比較的大きな病斑形成が見られたのに対し，抵抗性系統９および13の葉では，顕著な病斑形成は見られなかった（Fig. 11）．菌叢片接種の場合でも，抵抗性系統９および13の葉では病斑形成は認められなかった．

３．考　察

260品種に対する感受性試験では，供試した３菌株の *C. dematium* は，有傷あるいは無傷接種により大半のクワ品種に対して，病斑を形成した．しかし，その形成程度は品種によって大きな差が見られ，「岩瀬」，「大早生」，「群馬赤木」および「大和早生」等では，病斑が全くあるいはほとんど形成されなかった．このことは，本菌に対する感受性は品種によって異なり，上述した品種の改変等により，さらに優れた形質を有する抵抗性品種が作出できうることを示唆するものである．また，各供試菌株において，無傷接種の場合よりも有傷接種で病斑形成程度が大きくなる品種が多かった．このことは，葉の表皮部が炭疽病菌の感染を抑制する一因として機能していることを改めて示唆するものであり，表皮部の持つ一時的な感染抵抗性の強弱が本菌に

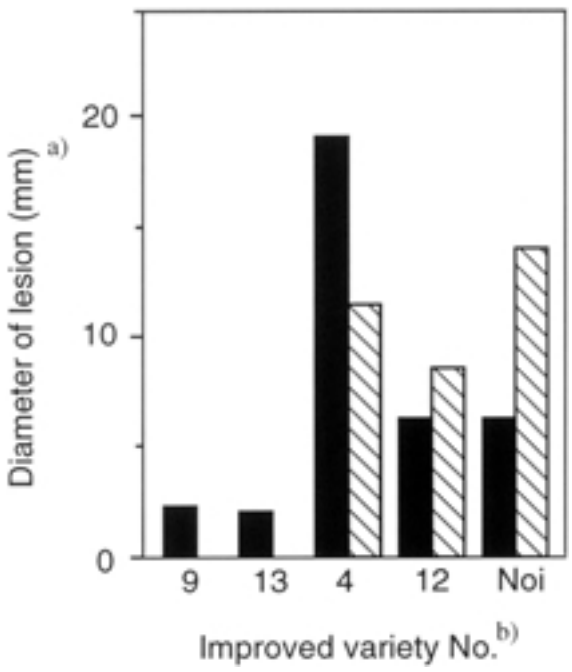

Fig. 11. Lesion formation on the leaves of improved variety inoculated with mycelial block or conidial suspension of *C. dematium* at punctured site. a) Each value represents the average of four determinations. b) Variety of seedlings. See Table 12. ▨, 10 μl of conidial suspension was placed at intact site of each leaf; ■, Mycelial block was placed at punctured site of leaves.

Table 12. Lesion formation on leaves of mulberry seedlings of each improved variety inoculated with *C. dematium* [a)]

No.	Strain			Disease incidence[b)]	
	♀	×	♂	April[c)]	May
1	Ookaraguwa (4x)		Minamisakari (4x)	33.0	0.0
2	Shiwasuguwa		Minamisakari (4x)	62.5	90.0
3	M38		Minamisakari (4x)	75.0	60.0
4	Ookaraguwa		Noi	87.5	90.0
5	Hon84-26		No.3001	75.0	40.0
6	Wasemidori (4x)		Higashi85-04	41.5	47.5
7	Ooshimaguwa (self)		Ooshimaguwa(self)	87.5	
8	Hon86-01 (4x)		No.3001	25.0	40.0
9	Kenmochi		Hayatesakari (4x)	0.0	0.0
10	Po		Minamisakari (4x)	41.5	100.0
11	Hon84-60		Noi		87.5
12	Mitsuminami		Noi	100.0	100.0
13	Kairyouichinose (4x)		No.3001	12.5	0.0
14	Tokiyutaka		Kairyounezumigaeshi	25.0	12.5
15	Higashi84-60		Tanakaoushuu		10.0
16	Hon67-07		Kairyounezumigaeshi	75.0	32.5
17	Kairyouakita		Tanakaoushuu	25.0	0.0
18	Higashi86-01		Tanakaoushuu	62.5	20.0
19	Kenmochi		Hayatesakari (4x)	37.5	0.0
20	Keguwa		Keguwa		52.5
21	Mitsuminami		Shin-ichinose(4x)	16.5	0.0
22	Hon84-26		Higashi85-04	0.0	46.5
23	Hon67-07 (4x)		Noi	100.0	62.5
24	Kosou197		Kosou199	29.0	
25	Wasemidori (4x)		Noi	66.5	60.0
26	Higashi86-01		Yukishinogi		16.5
27	Shiwasuguwa		Hayatesakari (4x)		20.0
28	Kairyouichinose		Hayatesakari (4x)		0.0
29	Hon69-03		Hayatesakari (4x)	33.0	
30	Shiromekeisou		Hayatesakari (4x)		0.0
31	Kataneo		Hayatesakari (4x)		12.5
32	Ookaraguwa		Hayatesakari (4x)	33.0	22.5
33	Shiromekeisou		Hon65-87		40.0
34	Mitsuminami		Hon65-87	37.5	43.0
35	Hinosakari		Hon65-87	50.0	10.0
36	Wasemidori		Hon65-87	45.5	0.0
37	Hon74-01		Kosou199	70.5	40.0
38	Wasemidori		Kosou199	49.5	
39	No.3118		No.3118		40.0
40	Kairyouichinose		Kosou199		50.0
41	Ookaraguwa		Shin-ichinose	0.0	30.0
42	Hinosakari		Higashi85-04	12.5	25.0
43	Mitsuminami		Hayatesakari (4x)	25.0	20.0
44	Ichinose		Kokusoudai21gou		25.0
45	Shiromekeisou		Chuu75-42	50.0	87.5
46	Higashi84-60		Kokusoudai21gou		75.0
47	Hinosakari		Higashi85-04		20.0

a) Conidial suspension of *C. dematium* was inoculated on the leaves by spreading with an artist brush.
b) Each incidence represents the average of two determinations. Blank means inoculation was not conducted.
c) Date of the inoculation: April, April 24; May, May 6.

対する品種感受性差異の大きな要因となっているものと考えられる．一般にクワ葉は，成葉化に伴い表皮部が発達し硬化する傾向を示し，その程度も品種により異なる（渡辺ら，1989）が，クワ葉の表皮細胞層およびクチクラ層の厚さは，クワ褐斑病菌*Cercospora moricola*等に対する抵抗性に関与していることが知られている（Govindaiah *et al.*, 1990）．これらの事実はクワ葉の表皮部が本菌に対する抵抗性に関与している可能性を示すものと思われる．

一方，病原菌の側から見た場合，今回供試した３菌株間での各クワ品種に対する病原性の違いは明確でなかった．このことより，本菌においては，レース分化の可能性は少ないものと推察されるが，結論を出すためには，供試菌株を大幅に増やして検討する必要がある．

また，今回の試験において，260品種の感受性あるいは抵抗性の程度を倍数性および系統別に比較した結果，倍数性別の場合には２倍性品種よりも３倍性品種で抵抗性が高い傾向が見られた．ウリ科野菜の炭疽病菌である*C. lagenarium*に対する抵抗性は，２倍性のものより３または４倍性の宿主植物（スイカ・キュウリ等）で高いことが知られており（池上，1984b），木本植物であるクワにおいても同様の傾向が見られたことになる．次に，系統別で比較した場合は，明瞭な違いはないものの，大きな病斑を形成した品種の割合は，カラヤマグワ系がヤマグワおよびログワ系品種に比べ高かったことから，カラヤマグワ系が比較的高い感受性を有するものと考えられる．

各供試クワ品種の若葉および成葉に対する感受性差異を検討した結果，成葉は若葉に比べ高い抵抗性を示すことが明らかとなった．その理由の一つとして，成葉では表皮細胞層が肥大し葉が硬化していることが挙げられる．一方，クワ葉の動的抵抗性因子としてはファイトアレキシンがあり，その生成および蓄積量は若葉よりも成葉で多いことが知られている（白田, 1984）．成葉で見られる本菌に対する抵抗性の発現には，このような抵抗性因子も関与していることが十分に考えられる．

今回，育種途中にある47の交配系統について本菌に対する抵抗性を比較した結果，交配用の親にタイ産のクワ（品種「ノイ」）を用いた系統において，感受性が高い傾向が見られた．このことから，「ノイ」は本菌に対して強い感受性因子を持つ品種，あるいは抵抗性因子が少ない品種である可能性が考えられる．また，本菌に対する感受性（罹病性）の遺伝様式については，さらに詳細な検討が必要であるが，「ノイ」の交配系統でいずれも感受性が高かったことから，感受性の形質は優性的に遺伝することが推察される．一方，病原菌に対する宿主植物の特異的抵抗性の遺伝的背景を説明するものとしてFlorの提唱した遺伝子対遺伝子説（Gene-for-gene hypothesis）が知られている（平井ら，1989）．この考えは，病害抵抗性が優性の形質として遺伝的支配を受けているという原則の上で成り立っているが，本菌とクワとの関係においても，こうした遺伝子対遺伝子理論が適応するのかについては，興味深い研究課題である．また，実生苗で抵抗性または感受性を示した交配系統について，その後さらに生育させて得られた成葉の感受性程度を調査した結果，成葉と実生苗での感受性程度はほぼ比例することが認められた．このことは，クワの実生苗が，本菌に対するクワ品種または系統の感受性検定用の検定植物として利用できることを示唆するものである．

Ⅵ　クワ炭疽病菌*C. dematium*によるクワ炭疽病の発生生態

C. dematium（＝*C. morifolium*）による本病の発生については若干の記載（木村，1979；高橋，1988）はあるものの，年間を通した詳細な調査はなされていない．本章では，当研究所内の桑園圃場において，本病の自然発生の定点調査を行い，発生消長を明らかにするとともに，クワ葉の時期別および葉位別での本菌に対する感受性の差異についても，発病調査ならびに接種試験により検討し，自然発病との関連について考察した．また，1994年６月下旬に，当研究所内の育苗床において，育種用に育成された実生苗で，移植直後に本病の突然の激発症例が観察された．そこで，育苗床での本病の発生生態を調べるとともに，激発時の育苗床における伝搬試験により，伝搬経路についての検討を行った．さらに，この育苗床での激発の要因として，植物

体中の栄養条件の可能性が示唆されたことから，クワの施肥条件，特に窒素施肥量と本病発生との関連について検討した．

また，本病の発生消長の結果より，本病の越冬源（第一次伝染源）は桑園土壌中の*C. dematium*であると考えられたので，本菌の冬期における土壌中の越冬性および越冬形態について調べた．

１．圃場における発病とその拡大

(1) 材料および方法

ａ　自然発病定点調査

本病の発生消長を知る目的で，桑園圃場における自然発病の定点調査を行った．調査圃場は当研究所内の桑園内とし，植え付け約17年後のクワ品種「しんいちのせ」の春切り株（３月に株の基部から枝を伐採）30株および植え付け約９年後の夏切り株（３月および６月に伐採）50株を調査対象株とした．なお，対象としたこれらの株は畝状に植えられており，株高はいずれも30～40cmで，株基部からそれぞれ10～15本の枝条を垂直～平行の角度に渡って伸ばしている．調査時期は８月～11月までの間とし，毎月１回の調査を春切り株では1993年および1994年の２年間，夏切り株では1993～1995年までの３年間行った．また調査内容は，各株の枝条の中から５～８本の枝条を選び出し，それらに着生する葉の中で本病の典型的な病斑を有する葉の数を計測するものとした．罹病葉の計測は，地面からの高さ別に３段階，すなわち地面～50cm，51cm～120cm，121cm以上に分けて行った．

ｂ　クワ枝条における葉位別発病調査

クワの葉位と本病発生との関係を見る目的で，葉位別の自然発病調査を行った．上述と同様の「しんいちのせ」の夏切り株において，標準的な長さの３種類の枝条，すなわち直立枝，地表面とほぼ平行な枝および両者の中間的な角度の枝を選び，これらの枝条に着生する全てのクワ葉について上述と同様に自然発病調査を行った．なお，発病が見られた葉についてはその病斑数によって，１～３個（少），４～10個（中），11個以上（多）の3段階に分けた．また，調査は1993年および1994年の10月に行い，各回3株について調査した．

ｃ　クワ炭疽病菌の時期別および葉位別圃場接種試験

クワ葉の本菌に対する感受性の程度を時期別および葉位別に見る目的で，次のような圃場接種試験を行った．*C. dematium* S8901株を供試菌株とし，前述と同様に調製した分生子懸濁液（約10^6個/ml）を接種源とした．また，供試したクワ株は植え付け約８年後の品種「しんいちのせ」の春および夏切り株とし，春切り株では1996年の７～10月，夏切り株では1995年の９月および10月に，各株で1本選出した枝条に着生する全ての葉に上述の接種源をスプレー器で噴霧接種した．接種は毎月１回２本の枝条に行い，接種後は枝条をビニール袋で一晩被覆した．14日後に病斑形成の有無を調べ，形成葉についてはその病斑の占める面積により，１～30％（軽微），31～60％（中間），61％以上（激しい）の３段階に分けて評価した．

(2) 結　果

ａ　定点調査

自然発病の定点調査を行った結果，調査年における本病の初発は，いずれの年も６月下旬～７月上旬にかけて観察された．春切り株では，発病葉数は調査年によって数の変動は見られたが，いずれの年も８月には少なく，その後次第に増加し11月に最大となった．また，高さ別で見た場合，いずれの月でも地表面に近い部位での発病が多く，11月には中間及び上位の葉でも発病が比較的多く見られた（Table 13）．また発病程度も，各調査月において地表面に近い部位での葉で高い傾向を示した．夏切り株の場合も，年別により変動はあったが春切り株とほぼ同様の発生消長を示し，いずれの月も地表面に近い部位での発病が多く見られた．

ｂ　枝条における葉位別発病調査

夏切り株の葉位別発病調査の結果をFig. 12に示した．1993年の調査では，各株それぞれの３種類の枝条で，その発病部位と葉位との間に共通の傾向は見られなかった．しかし，いずれの株も地表面とほぼ平行な枝条では，葉位に関係なくほとんどの葉で発病が見られ

Table 13. Number of leaves with symptoms of anthracnose per mulberry tree in fixed points of the field

Trees / Date of survey	Infected leaves per tree: Position[a] Lower	Middle	Upper	Mean length of a vertical shoot (cm)[b]	Mean number of leaves on a vertical shoot[b]
Spring-pruned trees					
2 August 1993	1.35±0.31[c]	0.08±0.04	0	200	40
2 September 1993	4.70±0.63	0.35±0.13	0.03±0.02	264	56
5 October 1993	9.18±1.02	2.35±0.29	0.80±0.23	280	80
2 August 1994	0.45±0.15	0	0	200	51
2 September 1994	9.50±0.91	0.73±0.18	0	270	60
4 October 1994	13.95±1.06	2.55±0.31	0.40±0.11	283	84
7 November 1994	17.35±2.07	14.95±1.25	11.38±1.01	290	92
Summer-pruned trees					
2 August 1993	1.26±0.20	0		100	23
2 September 1993	6.98±0.73	0.12±0.04	0	176	53
5 October 1993	9.16±0.74	2.12±0.23	1.00±0.11	197	60
2 August 1994	0.24±0.06	0		100	26
2 September 1994	3.86±0.37	0	0	180	54
4 October 1994	9.08±0.57	0.58±0.13	0	200	65
7 November 1994	27.62±1.64	7.72±0.81	1.78±0.27	215	67
2 August 1995	0.56±0.15	0		87	21
1 September 1995	0.72±0.12	0	0	180	43
1 October 1995	9.20±0.69	0.58±0.10	0.04±0.02	200	56
2 November 1995	19.74±6.54	3.36±0.36	0.14±0.05	224	63

a) Height of leaves from the ground: lower, 0-50 cm; middle, 51-120 cm; upper, above 121 cm.
b) Measurement was performed in a observed tree which had average length of vertical shoots.
c) Average number of the infected leaves and standard error per observed tree.

た．また，これ以外の２本の枝条についても，比較的地表面に近い部位の葉での発病が目立つ傾向にあり，発病程度も平行な枝条の葉と比較して軽微であった．この傾向は1994年の調査でも認められた．

ｃ　時期別および葉位別接種試験

夏切り株について，接種試験を行った結果，９月および10月とも上位および中間に位置する葉で発病しやすい傾向が見られた（Fig. 13）．また，発病程度は10月より９月で大きかった．

春切り株についての葉位別発病程度は，接種した月により変動が見られたが，７月以外の月では下位葉よりも上位葉で発病しやすい傾向が見られた．７月の接種では，先端葉(接種後の保持期間中に展開した葉)を除いたほぼ全ての葉で発病が見られた．また，発病程度を月別で比較した場合，特に７月および10月の大部分の発病葉で発病程度が大きかった．

２．育苗床での激発と菌の伝搬経路

(1) 材料および方法

ａ　クワ育苗床

激発の見られた育苗床は，毎年新系統の実生クワ苗を育成する場であり，その大きさは約53.7m×39mで，内部に植え付け用の床土の入ったコンクリート製のフレーム（約7.1m×1.4m）を28箇所配置している．そのフレーム内の床土に，温室内で芽出し後に生育させたクワ実生苗を毎年６月頃移植し，２～４ヵ月間育成している．なお，本病激発時には，幾つかのフレームにおいて，実生苗ではなく２～５年生の複数の品種から

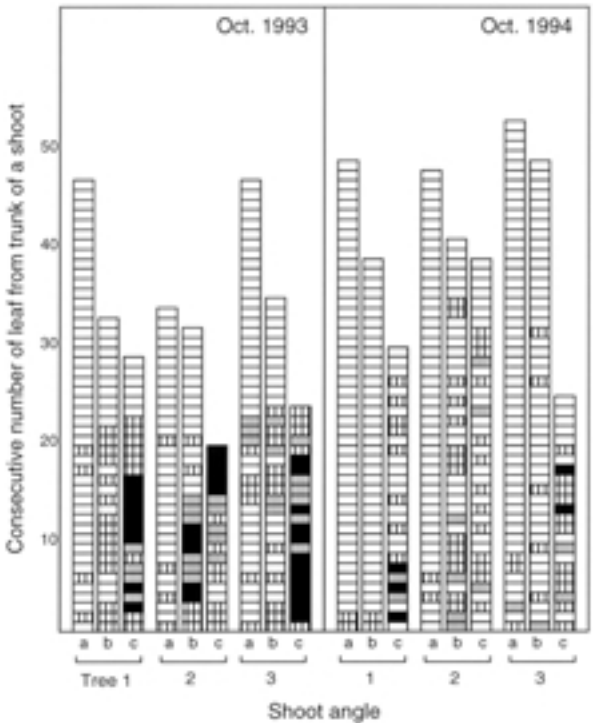

Fig. 12. Natural anthracnose disease in a shoot holding at different angles (a: ca. 90 °, b: ca. 45 °, c: ca. 0 °) of summer-pruned trees. Each square of a vertical line represents a leaf of a shoot. Disease severity of a leaf based on number of lesion : □, not diseased; ▥, slight; ▭, moderate; ■, severe.

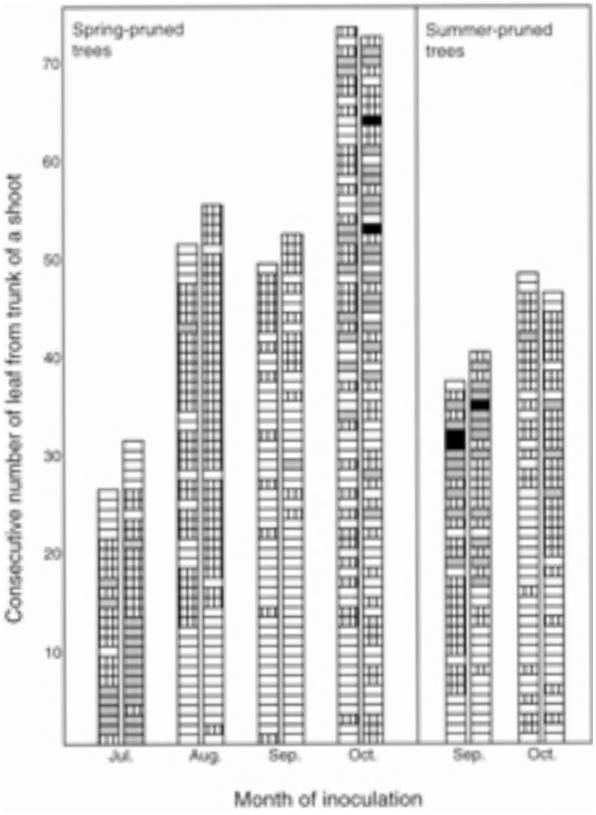

Fig. 13. Anthracnose disease in shoots inoculated with *C. dematium* on each month. Each square of a vertical line represents a leaf of a shoot. Disease incidence of a leaf: □, not diseased; ▥, slight; ▭, moderate; ■, severe.

なる立毛のクワが１フレームあたり３～７株植えられており，各株それぞれの枝条にはクワ成葉が着生していた．また，この育苗床施設の地面は，フレーム周囲で不耕起の土である以外は全てコンクリートで覆われている．フレーム内の床土については苗の移植前に常法によるクロールピクリン消毒がなされており，移植後の苗は，フレーム周囲に設置されてある自動潅水装置で1日当たり30分×２回の潅水および適量の施肥により管理した．この育苗床内部の平面配置をFig. 14に示した．また，本病激発時に，各フレーム内で栽培されていたクワの種類および系統をTable 14に示した．

b　自然発病調査

育苗床内での本病発生の調査は２回行った．１回目の調査は本病の初発が見られた1994年６月下旬，２回目の調査はおよそ２ヵ月後の1994年８月下旬に，それぞれ各フレームごとに行った．実生苗を移植してあるフレームについては10株をランダムに選び出し，それぞれの苗の葉にある本病病斑の有無により発病を確認し，その発病株の数により発病度を４段階に分けた．すなわち，０株(－)，１～２株(+)，３～５株(++)，６株以上（+++）とした．また，立毛クワについては，地際部の葉での発病葉数により，０枚（－）１～５枚（+），６枚以上（++）の３段階に分けた．

c　伝搬試験

本病の伝搬経路について，本病の激発した育苗床をモデル実験圃場として，同年７月上旬に検討した．

①伝搬試験区の設定：　伝搬試験のための試験区を育苗床の中の３箇所に設定した．A区：本病激発苗の植え付けられているフレーム内，B区：A区に隣接し，

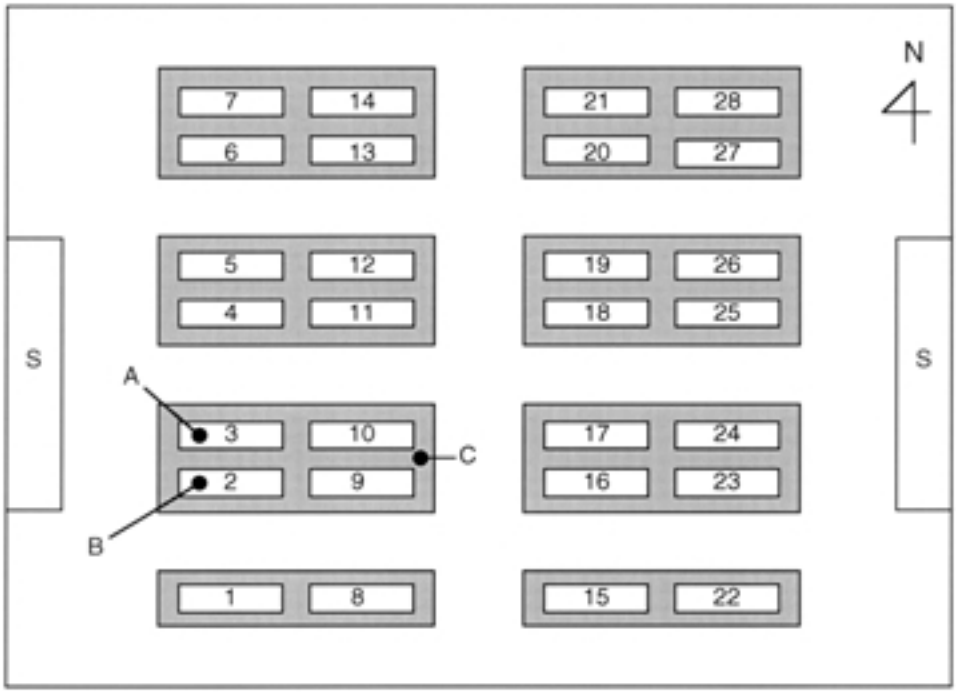

Fig. 14. Schematic plane representation of the nursery bed. Number in each square indicates the frame No. for transplanting the seedlings. Three places designated 'A', 'B' and 'C' represent the experimental plots set up for the transmission test. The ground is covered with concrete, except that the areas depicted with ▭ are covered with unplowed soil. 'S' : shed.

２～５年生の立毛クワが植えられているフレーム内，C区：A・B両区からほぼ同じ距離にありクワが植えられていないフレームの外側，の３区とし，以下の試験を行った．設定した試験区の場所をFig. 14の平面配置図の中に示した．なお，B区に植えてあるクワの地際部付近の葉には，自然発病による病斑が苗の植え付け時に複数個観察されていた．

②検定苗の設置：　植え付け後に激発の見られた苗と同系統で，本葉が３～４枚展開した健全実生苗（♀大唐桑×♂はやてさかり）を検定植物とし，それらを１個体ずつ直径4cm，高さ5.5cmのプラスチックカップに移植した．これを各試験区それぞれの５箇所に設置し，どの苗が発病するかにより本病の伝搬経路を推定した．すなわち，各区において（a）地面から約40cmの高さの所，（b）地面から約80cmの所，（c）地面，（d）地面に置いた直径22cmの円形プラスチックバットの上，（e）地面に置いた直径34cmの円形プラスチックバットの上の各所に苗を設置し，設置はいずれも３ポットずつとした．また，苗の生育不良の影響を見るために（c）所だけは比較的生長不良の苗を３ポット増やして設置した．設置期間は３日間で，その間に降雨が計約７時間あった．設置完了後はポットを約25℃の湿室に保持し，その後は室内に移し６日後に発病調査を行った．調査は苗の葉に出現した赤褐色の病斑の有無で判定し，その病斑数の程度により，０個（－），１～３個（+），４個以上（++）の３段階に分けて表示した．

(2) 結　果

ａ　育苗床における炭疽病の激発

発病の見られた苗は葉に褐色の壊死斑が現れ（Fig. 15-1），発病程度が著しい場合では落葉も認められた．これらの病斑部から常法により分離を行った結果，*C. dematium*が分離され，分離菌株の分生子懸濁液および菌叢片は健全クワ葉に病原性を示した．

発病の見られたフレームでは，発病の程度に差は見られるものの，フレーム内全面の苗に発病が拡がり，

Table 14. Natural infection of mulberry seedlings and trees in frames in the nursery bed

Frame No.[a]	Improved variety[b]			Disease severity[c]	
	♀	×	♂	June[d]	August[d]
1*		T		–	–
2*		T		++	++
3	Ookaraguwa		Hayatesakari	+++	+++
4	Ookaraguwa		Hayatesakari	+++	+
5	Ookaraguwa		Hayatesakari	–	++
6	Kairyou-ichnose		Kosou 199gou	–	+++
7	Hinosakari		Hon 65-87	+	+
8*		T		–	++
9	Kairyou-ichinose		Hayatesakari	–	+++
10	Kataone		Hayatesakari	+	+++
11	Higashi 85-04		Shiwasuguwa	–	+
12	Hon 69-03		Hayatesakari	–	+++
13	Hon 75-05		Benikararoguwa	+	+++
14	Kosou 197gou		Shin-ichinose	++	+++
15*		T		–	++
16*		T		–	++
17	Hon 75-05		Kokusoudai 21gou	–	+
18	Shiwasuguwa		Hayatesakari	–	+
19	Kenmochi		Ogasawara 5		+
20	Keguwa		Keguwa		–
21	Keguwa		Keguwa		–
22	Shiromekeisou		Hon 65-87		–
23		#			
24	Shiromekeisou		Hayatesakari	–	++
25	Hon 74-01		Kosou 199gou	–	+++
26*		T		–	–
27		#			
28		#			

a) Each number corresponds to the frame number designated in Fig. 14. The frame No. added * represents the frame in which mulberry trees were cultivated.
b) Seedlings transplanted in each frame. ' T ' indicates the mulberry trees cultivated in the frame. '#' indicates no plants were cultivated in the frame.
c) Number of the diseased seedlings per ten seedlings: 0, –; 1 or 2, +; 3-5, ++; 6-10, +++. In the frame with *, number of diseased mature leaves per tree: 0, –; 1-5, +; over 6, ++. Blank indicates no seedlings were transplanted.
d) Date of survey : June, June 30, 1994; August, August 31, 1994.

Fig. 15-1. Infected seedlings in the frame No. 3 (see Fig. 14).
-2. Growth recovery of infected seedlings.

その発病は苗の系統（品種）に関係なく認められた．各フレームにおける苗の発病程度をTable 14に示した．６月下旬の初発時で，著しい被害が見られたフレームは，３および４番のフレームであり，また，立毛のクワが栽培されていたフレーム（２番）においてもその地際部付近の葉で，本病の夏期に見られる特徴的なハローを伴った病斑が数多く認められた．なお，苗の色で発病程度を比較した場合，黄化した移植苗ほど発病が著しい傾向を示した．２回目の調査日である８月下旬では，発病苗は多くのフレームで見られるようになり，３および４番等の激発フレーム内の発病苗は，一部のものは落葉後に枯死したが，大半の苗は落葉後も新葉を展開し，生長を回復して枯死することはなかった（Fig. 15-2）．しかしⅦ章の３の手法により本病の潜在感染を調べた結果，これら見かけ上生育を回復した大半の苗の葉では，本菌が潜在的に感染していることが認められた．

b　伝搬試験

各試験区に設置した検定用苗の発病程度をTable 15に示した．苗の発病は，A区およびB区で見られ，C区では発病は見られなかった．また，発病の見られた区において設置場所別に見ると，c，dおよびe所で発病が見られ，特にc所では顕著な発病が見られた．それに対し，40および80cmの高さに設置した苗（a，b所）では発病は観察されなかった．なお，これらの発病苗の病斑上からは，本菌が分離された．

３．発病に及ぼす施肥の影響

（1）材料および方法

a　供試クワ

試験に用いたクワ品種は「落井」および「しんいちのせ」とした．無肥料土に緩効性肥料（丸桑特２号）を所定の窒素施肥量になるように加えて作成した土壌を5000分の1aのワグネルポットに入れ，２種のクワ接木苗を５月26日に定植した．土壌中の窒素施肥量は，10a換算で 0，5，15，30，60kgになるように調製し，「しんいちのせ」ではさらに22.5kgに調製した土壌も用いた．なお，通常の栽培で標準的な窒素施肥量は30kg/10aであり，22.5kg/10aは適正とされる窒素施肥量の最低量を示している．定植後の管理はガラス室内で行い，肥料の流亡を防ぐためポットの排水口に栓をして，灌水は根腐れを防ぐため毎日数回少量ずつ行った．以上の管理下のもとで育成し，無施肥土壌および施肥土壌（15kg/10a）で育成した「落井」が生長を停止した時点，すなわち８月18日および９月29日における各クワポットをそれぞれ１回目および２回目の試験用クワとして供試した．

b　感受性検定

各施肥条件のクワの枝先端から約10～15cm付近の成葉を２または３ポットから３枚採取し，前述と同様に調製・作成した*C. dematium* S8901株の分生子懸濁液（3×10^6個/ml）10μlを有傷および無傷滴下接種した．

Table 15. Formation of anthracnose lesion on the seedlings placed at various locations in the bed

Locations [a]	Plots [b]								
	A			B			C		
(1) 80 cm height	– [c]	–	–	–	–	–	–	–	–
(2) 40 cm height	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(3) ground	++	++	++	+	+	–	–	–	–
(4) ground (small seedlings)	+	+	–	–	–	–	–	–	–
(5) on bat (22 cm in diameter)	+	–	–	+	–	–	–	–	–
(6) on bat (34 cm in diameter)	–	–	–	+	–	–	–	–	–

a) (1), (2), (3), (4), (5) and (6) corresponds to (a), (b), (c), (c), (d) and (e) in the text, respectively. (4): seedlings which delayed the growth were used.
b) A, inside of frame No.3; B, inside of frame No.2 where mulberry trees were cultivated; C, between frame No.9 and frame No.10.
c) Number of necrotic spots on the leaves per a seedling: 0, –; 1-3, +; over 4, ++.

また，菌叢片についても前述と同様に有傷接種した．接種後は，湿室内で7日間保持した後，各葉での病斑形成程度により，本菌に対する感受性程度を検討した．

(2) 結　果

C. dematium に対する各施肥条件のクワ葉が示す感受性は，供試品種により大きく異なった．すなわち，感受性品種である「落井」に対しては，両試験において，窒素の施肥量に関係なく，分生子の有傷・無傷および菌叢片接種いずれの接種によっても顕著な病斑形成が見られた（Fig. 16）．一方，普及奨励品種「しんいちのせ」に対しては，１回目の試験での分生子接種を除くいずれの接種源または接種法でも，窒素施肥量が０，５，および60kg/10aのクワで病斑が拡大する傾向が見られた（Fig. 16）．

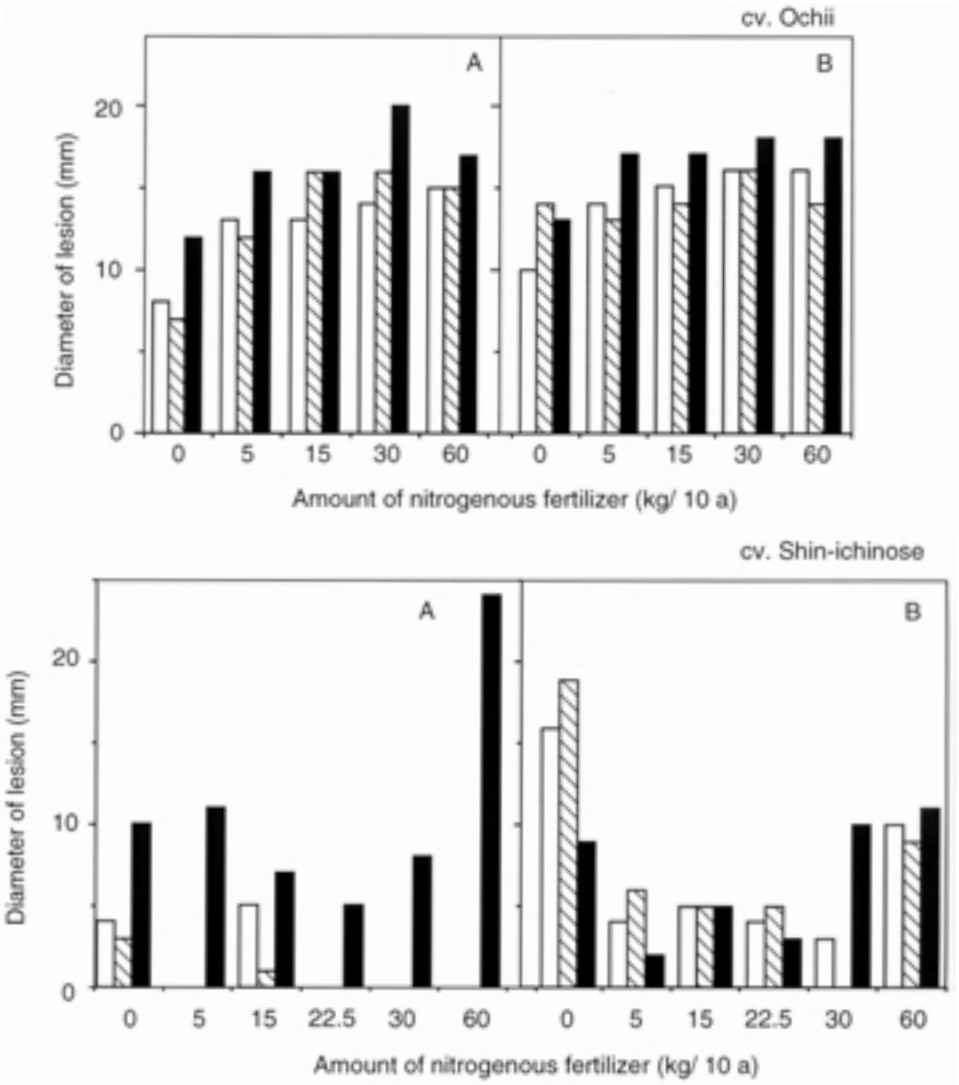

Fig. 16. Lesion formation produced by *C. dematium* on mulberry leaves grown in soil containing each amount of fertilizer. Grafted sapling of each cultivar was planted in a pot on May 26, and mulberry leaves were used for the inoculation on August 18（A）and on September 29（B）. Each value represents the average of three determinations. □, Conidial suspension（10μl）was placed at intact site of leaves. ▨, Conidial suspension（10μl）was placed at punctured site of leaves. ■, Mycelial block was placed at punctured site of leaves.

４．土壌中および罹病葉での越冬

(1) 材料および方法

ａ　分生子の土壌中での生存

C. dematium の分生子の野外での生存性について調べた．12月に野外より炭疽病菌の混在していない土壌を採取し，ふるいに通した後水抜き穴を開けた直径９cmのシャーレに約30g入れた．土壌中の他の微生物の影響を除外するために，オートクレーブ滅菌（121℃，20分）処理した土壌も用い，同様にシャーレ内に入れた．これらのシャーレ内の土壌に，前述と同様にMSAの平板上から調製した*C. dematium* S8901株の分生子懸濁液（５×10^{6}個/ml）８mlを，薬耳で土をよくかき混ぜながら噴霧器でスプレー接種した．接種土は，野外，および雨または雪が入り込まない野外（以降屋外とする）それぞれに設置した．病原菌の生存および定量は，経時的に土壌（0.2g）を各シャーレから回収し，目的の菌の分離により行った．すなわち，回収した各土壌の所定の段階希釈液（0.5ml）を，ストレプトマイシン（30mg/l）添加PSA培地の平板上にＬ字棒を用いて２枚のシャーレにそれぞれプレートし，約５日間室内で培養後，各シャーレに出現したコロニー数の平均値から土壌中の生存分生子数を算出した．さらに，温室内で栽培した感受性品種「落井」を採取し，剣山を用いて葉全体に傷をつけた後，0.2gの土壌を1.8mlの蒸留水に懸濁して作成した土壌懸濁液（約１ml）を筆で葉の裏面に塗付接種し，５～10日間湿室内で保持した後，本菌の生存を剛毛を伴った病斑形成の有無によって確認した．また，無病徴葉に関しては，本菌が潜在的に感染しているのを確かめるため，Ⅶ章の３で示した手法に従い，UVを葉の裏面に５分間照射して病斑を顕在化させて感染を確認した．なお，同条件下で調製した土壌懸濁液をクワ葉に接種した場合，病斑を形成しうる土壌中の分生子最低密度は，約80個/g乾燥土であった．

ｂ　罹病葉中での生存

温室内で栽培したクワ品種「一ノ瀬」の成葉を12月に採取した．これらの葉を上述と同様の手法で作成したS8901株の分生子懸濁液（約10^{6}個/ml）中に浸漬し，湿室中に約７日間保持して葉全体に病斑を形成させた後，風乾して乾燥罹病葉を作成した．また，同様に湿室中に２日間保持して，葉に病斑が形成される前に風乾した乾燥潜在感染葉も作成した．これらの葉を６～10cm^{2}に切断した後，厚紙で作った箱（12×24×５cm）の中に上述と同様の自然土壌（250g）とともに入れ，よく混和した後，箱をナイロンメッシュで覆った．これらの箱を上述と同様に野外および屋外に設置し，その後経時的に各箱から罹病葉を取り出し，以下の２つの手法で本菌の生存を確認した．①：取り出した葉を細断して70％エタノールに約30秒浸漬後，PSA平板上に移植し，さらにその上からストレプトマイシン1000ppm液を10ul滴下した．約５日間培養後，菌糸生育の有無で罹病葉中における菌の生存を確認した．②：それぞれの土壌中から0.5gの乾燥葉を取り出し，30mlの蒸留水とともに50ml容のコニカルチューブに入れ，ホモジナイザー（ヒスコトロン）で約30秒間粉砕した．磨砕懸濁液を800×g，10分間遠心分離し，上清を捨てた後，沈澱物に２～４mlの蒸留水を加え再び懸濁したものを，剣山で傷を付けた「落井」の切り取り葉の裏面に筆で塗付した．塗布後は湿室内に約10日間保持し，その後病斑の出現の有無により本菌の生存を確認した．また潜在感染についても上述と同様にUV照射により顕在化させ，病斑形成の有無を確認した．

ｃ　室内環境下における罹病葉中での生存

C. dematium の罹病葉中での室内環境下における生存について調べた．上述と同様に作成した乾燥罹病葉を，滅菌した乾燥土壌を詰めた直径15cmのガラスシャーレに埋没させ，0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35℃に設定したインキュベーター内に保持した．保持後は，罹病葉を経時的に取り出し，上述と同様に分離を行い，菌糸生育の有無で菌の生存を確認した．

(2) 結　果

ａ　分生子の土壌中での生存

C. dematium の分生子の野外土壌での越冬期間について検討した結果，野外設置土壌からは，自然土壌および滅菌土壌いずれにおいても，設置14日後まで菌は分離された（Fig. 17）．屋外に設置した土壌からは，非滅菌土壌から51日後まで菌は分離されたが，その間菌が

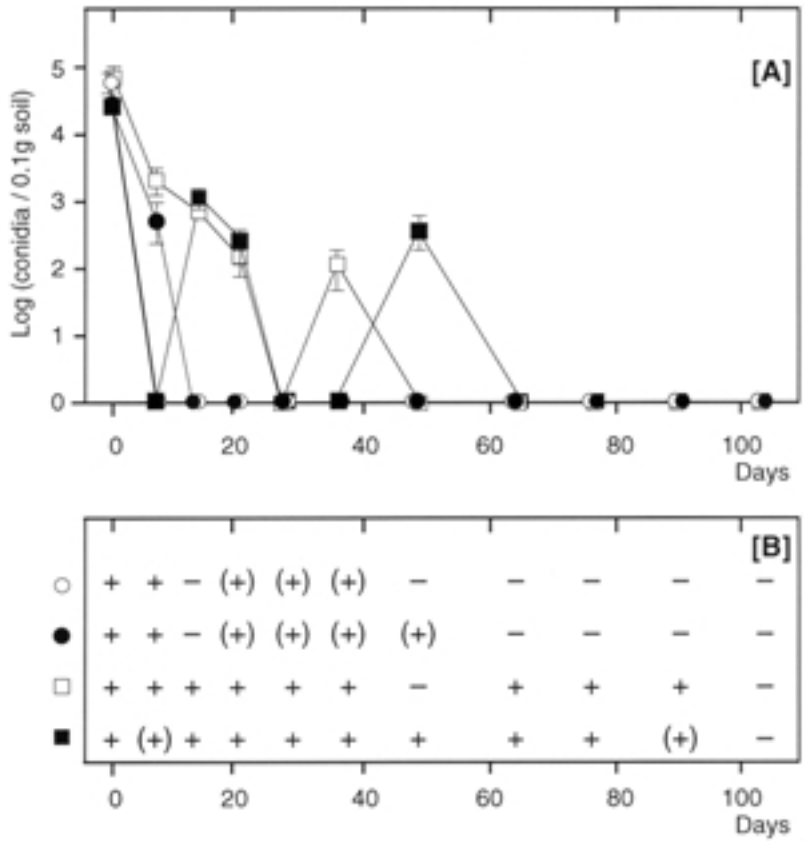

Fig. 17. Overwinter survival of conidia of *C. dematium* in soil at two locations in December 1997. [A] Number of viable conidia recovered from soil. The number in each assay was evaluated based on the average number of the colonies on two replicate plates. Bars represent standard error of the mean. [B] Lesion formation on the leaf with setae: +, detected; −, not detected. ( ) represents the latent infections revealed by irradiation with ultra-violet rays. Symbol: ○, in sterilized soil placed outdoors; ●, in nonsterilized soil placed outdoors; □, in sterilized soil placed under the roof; ■, in nonsterilized soil placed under the roof.

検出されなくなる場合も見られた．なお，自然土壌からの分離では，他の土壌生息菌が多く分離された．

また，土壌懸濁液を健全クワ葉に塗布接種した場合では，野外設置土壌および屋外設置土壌それぞれにおいて，51日後および94日後までに回収した土壌の懸濁液接種で病斑形成が認められた．

b　罹病葉中での生存

罹病葉から本菌を経時的にPSA上で分離した結果，菌は設置90日後まで検出された（Table 16）．120日後の分離では，菌は検出されず，他の土壌生息菌が分離されるようになった．また，菌の分離頻度は，回収日により変動が見られるものの，野外に設置した潜在感染乾燥葉からの分離頻度が高い傾向を示した．また，罹病葉の磨砕懸濁液をクワ葉に有傷塗布した結果では，いずれの設置罹病葉および潜在感染葉の懸濁液とも，設置150日後でも病斑形成が認められた．

c　室内環境下における*C. dematium*の罹病葉中での生存

罹病葉から菌が分離される期間は，保持温度により差が見られ，一般に低い温度で保持された罹病葉からは，長期間菌が分離された（Table 17）．すなわち，0℃で保持した罹病葉からは，菌は設置600日後まで分離され続けたのに対し，25℃または35℃で保持した罹病葉からは，菌は120日後には分離されなくなった．

Table 16. Overwinter survival of *C. dematium* in infested leaves in soil placed at two locations in December 1997

Location	Days after burial						
	0	7	30	60	90	120	150
Recovery (%) of the fungus [a]							
On the ground	4.7	3.3	0.0	32.9	0.0	0.0	0.0
On the ground (latent infection) [b]	100.0	41.0	21.4	41.4	2.5	0.0	0.0
Under the roof	9.4	2.9	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0
Lesion formation on leaves [c]							
On the ground	++ [d]	+	+	+	++	+	+
On the ground (latent infection)	++	++	+	++	+	+++	+
Under the roof	++	++	+	+	(+)	++	++

a) 50-80 pieces of infected mulberry leaves were placed on PSA plates.
b) Latently infected leaves were placed outdoors on the ground.
c) Suspension of infected leaves was spread on punctured mulberry leaves.
d) Disease severity was classified based on the area of the anthracnose lesion appeared on the leaves: +, 1- 30 %; ++, 31- 50 %; +++, over 51%. ( ) represents the latent infection revealed by irradiation with ultra violet rays.

Table 17. Survival of *C. dematium* in infested leaves at various temperatures [a]

Incubation days	Incubation temperature (°C)							
	0	5	10	15	20	25	30	35
30	100 [b]	100	50	75	100	–	100	50
60	100	75	100	100	100	75	100	50
90	75	100	100	75	100	25	50	50
120	100	50	75	50	75	–	50	–
270	100	25	–	100	–	–	–	–
390	100	–	–	–	–	–	–	–
600	75	–	–	–	–	–	–	–

a) Four pieces of the leaves were placed on PSA plates in each survey.
b) Recovery frequency (%) of *C. dematium*. –: not recovered.

5．考　察

本病の桑樹での自然発病を複数年にわたり調査した結果，いずれの調査年においても，本病は６月下旬～７月上旬の梅雨期にその初発が認められ，その後11月の落葉期まで発病葉が増加すること，さらに，その発病部位は地際部の葉から始まり，次第に上部の葉へと垂直的に移行することが明らかとなった．また，本病の初発は地際部の葉であることから，本病の第一次伝染源は，病原菌が何らかの形態で混在している桑園土壌ではないかと考えられる．すなわち，本病の第一次感染は，土壌中で生存している本菌が雨滴あるいはトラクター等の管理機の走行等により，地際部の葉表面に土とともに跳ね上げられ，葉面から侵入する経路により成立することが考えられる．雨滴による土の跳ね返りが病害の伝搬に重要な役割を持つことは，数種の炭疽病菌で知られており（Buchwaldt *et al.*，1996；Eastburn and Gubler，1990；Vizvary and Warren，1982；Muncie，1917），本菌においてもその可能性が十分に考えられる．

今回の自然発病調査において，地際部の葉で初発の認められた本病は，その後晩秋期にかけて時間の経過とともに，クワの上部に着生する葉へと移行する傾向が認められた．発病移行と，葉の葉位との関係を発病調査および接種試験により検討した結果，明確な関係は認められなかった．すなわち，各クワ枝条における葉位別の発病調査では，枝条の角度によって発病の葉

位および程度が異なり，むしろ地面からの距離との間に相関する関係が見られた．また，接種試験の結果では，自然発病が多く見られる下位葉と比較して，秋期でないと発病が認められない上位葉が，本菌に感受性である場合がほとんどであった．これらのことから，本病の初期発生および発病移行には，葉位による感受性の差異ではなく，圃場表面からの距離が強く影響していると推察された．

本病はクワの全生育期間で発生するとされている（高橋，1988）が，今回観察された育苗床における激発は，クワの幼苗期でも条件が整えば本病の大発生を招くことを改めて示唆するものである．激発をもたらした病原菌の伝染源については，立毛のクワが栽培されているフレーム内の土壌ではくん蒸消毒がなされていないこと，また，その地際部の葉は苗の激発時からすでに本病に罹病していたことから，これらのフレーム内の土壌で生存していた病原菌が伝染源となった可能性が考えられる．各種炭疽病菌の分生子の拡散には水が関与することが多く知られている（Boudreau and Madden, 1995；Correll *et al.*, 1994；小林, 1994；築尾, 1990）が，フレーム内の灌水はその周囲に張られたパイプからの一定時間のミスト状の散水により行われており，このミストおよび自然降雨により，フレーム内あるいはフレーム間に本菌の分生子が飛散することで育苗床内での発病が拡大・蔓延したものと考えられる．実際，伝搬試験の結果では，２日間の設置期間中に病原菌が伝搬され，設置した健全苗に感染した．地面に近接して設置した苗ほど発病しやすい傾向を示したことは，地面が重要な伝搬の媒体であることを示しており，土壌に飛散した分生子が雨滴等とともに跳ね上がり，それが健全葉に付着して新たな感染を引き起こすという伝搬経路が，この点からも支持される．なお，育苗床内で激発した苗の大半は，その後生長を回復したが，こうした見かけ上健全な苗の葉では，本菌が潜在的に感染していることが明らかとなった．こうした潜在感染葉は，その後の重要な第二次伝染源となりうることが容易に推察される．

今回の育苗床での激発の直接的な原因については不明であるが，発病苗はいずれも植え付け直前には苗全体に黄化が見られたことから，肥料不足による異常な生理状態であったことが激発の直接的な誘因になったと推察される．植物体内の栄養状態が病害発生に関係することは古くから論じられており（池上，1984b；木曽，1986；平井ら，1989），本病の場合もその関係を明らかにする必要があった．実際には，クワの肥培条件を変えた場合の病原菌に対する感受性の程度は，クワ品種により大きく異なった．感受性品種では，施肥量の影響はほとんど見られず，いずれも同程度の大型病斑を形成したのに対し，普及奨励品種では，施肥不足あるいは過多条件下で感受性が高まる傾向が見られた．このことは，通常の普及品種を用いた栽培では，適正な施肥条件が発病抑止に有効であることを示唆するものである．さらに，上記の育苗床での激発の要因の可能性として述べたように，植物体の栄養状態の不良は本菌に感染しやすくなることを改めて示している．

上述の*C. dematium*による本病の自然発生の消長および育苗床での発生の実態から，本菌は桑園土壌で越冬し，土壌中で生存していた菌が第一次伝染源となっている可能性が考えられた．そこで，本菌の分生子および罹病葉中の本菌に着目し，これらの冬期における生存性を調べた．*C. dematium*の分生子は，二次的な伝染源として大きな役割を担う（木村, 1979）が，冬期野外環境下では設置14日後までしか菌は再分離されず，分生子混和土壌の懸濁液のクワ葉に対する病原性も設置２ヵ月後には示さなくなった．本実験で行った土壌からの分離は，完全な選択分離培地を用いて行っておらず，他の雑菌により本菌がマスキングされている可能性があり，土壌中の菌密度については正確には論じることができない．しかし，経時的な分離結果から，自然土および滅菌土中の生菌数はいずれの設置場所でも減少し，野外設置ではその傾向が顕著であった．これらの結果から，本菌の分生子が単独で土壌で越冬し，翌年の伝染源となる可能性は少なく，あるとしても，その頻度は極めて低いものと考えられる．また，野外以外に設置した土壌での本菌分生子の生存は，いずれも野外設置土壌中よりも長期であった．この結果は，他の炭疽病菌で報告（Eastburn and Gubler, 1992；Vizvary and Warren, 1982）されているのと同様に，降雨等による土壌湿度の変化あるいは気温の変動が本菌分生子の生存に影響を及ぼすことを示唆するものである．

多くの炭疽病菌では，各宿主植物の葉（Buchwaldt *et al*., 1996；Norman and Strandberg, 1997），根（Dillard and Cobb, 1993），果実（Dillard and Cobb, 1998；Wilson *et al*., 1992）等の罹病残渣で越冬し，重要な第一次伝染源となることが知られている．*C. dematium* の罹病クワ葉からの直接の分離では，菌は設置120日後には検出されなくなったが，生存は健全クワ葉に対する病原性として，クワの新葉が芽生える時期である５月上旬まで確認された．このことは，落葉した罹病葉残渣で本菌が越冬できることを示唆するものである．

本菌の罹病葉中での安定した生存性は，室内実験によっても確かめられ，特に低温条件で長期間生存できることが明らかとなった．こうした結果からも，本病の罹病葉は*C. dematium* の越冬源として重要な役割を持ち，こうした罹病残渣の除去が，本病の効果的な防除に役立つものと考えられる．さらに，今回の試験において見かけ上健全な罹病葉でも菌の長期にわたる生存が確認されたことからも，潜在感染という感染様式で菌が越冬することも重要な伝染源となりうることが示された．

Ⅶ　クワ炭疽病菌 *C. dematium* の分生子の発芽・形成誘導因子および潜在感染の顕在化

本病の主たる病原菌*C. dematium* の分生子は，伝搬源として重要な役割を果たしている．そこで本章では，クワ葉上での分生子の発芽および形成形態を調べ，その結果に基づき，本菌分生子の発芽および形成を誘導する要因（因子）を探索した．さらに，炭疽病菌の特徴的な感染様式の一つに潜在感染（latent infection），すなわち感染はしているものの，宿主は見かけ上健全であり，その後発病条件が整うまで病徴を示さない感染様式がある（Muirhead and Deverall, 1981；Verhoeff, 1974；Swinburne, 1983）．本病においても潜在感染の可能性が考えられていたが，必ずしも明確にされていなかった．見かけ上健全な野外のクワ葉に紫外線を照射したところ，潜在していた炭疽病の病斑が誘発された．そこで本章では，本菌のクワ葉での潜在感染の実態について調べた．

１．クワ葉上での分生子発芽と初期感染

（1）材料および方法

ａ　供試菌株および分生子懸濁液の調製

C. dematium S8901株を供試し，MSAの平板上で室内環境条件下で培養した．培養５～８日目の菌叢の先端から10～20mmの地点に形成された分生子をかきとり，蒸留水で懸濁し，懸濁液をマイクロチューブに入れ，5000×gで５分間遠沈する方法で２回洗浄した後，蒸留水で分生子の濃度を約5×10^5個/mlとなるように調製した．

ｂ　分生子の発芽率および付着器形成率の測定

上記の方法で作成した分生子懸濁液を，７あるいは10μlずつスライドグラス上の２ヵ所に滴下した．このスライドグラスを，湿室に保ったシャーレに入れて各種温度に保った．一定時間後に分生子をラクト・フェノール・コットンブルー溶液で染色し，固定後，光学顕微鏡により分生子の発芽率および付着器形成率を調査した．なお，一部の試験では発芽管長も調査した．発芽率は400～500個の分生子の調査から，付着器形成率は発芽分生子100～150個の調査から算出した．また，発芽管長は，分生子の長径まで至らない場合を１，長径の１倍以上２倍未満を２，２倍以上３倍未満を３，３倍以上を４とし，40～50個の平均値で示した．

ｃ　クワ葉煎汁液の調製

乾燥したクワ葉50gを1.5ℓの蒸留水で約10分間煮沸した後に，煮汁をオートクレーブで殺菌処理したものをクワ葉煎汁液（M液）とした．これを上述の方法で作成した７μl の分生子懸濁液に７μl 添加することにより，M液の発芽に及ぼす影響を調べた．なお，M液に２％スクロースを加えたMS液および２％スクロース溶液の影響についても同様に調べた．

ｄ　各種植物の葉面溶出液の調製

葉面の水溶性成分の分生子発芽に対する影響を見るために，クワ葉および非宿主植物のイネおよびヤブツバキ葉の葉面溶出液を作成した．Blakeman（1968）の手法に従い，圃場で栽培されているクワ成葉（品種「し

んいちのせ」）15枚，温室内で栽培したイネ成葉（品種「コシヒカリ」）40枚および野外で植栽されているヤブツバキ45枚の健全葉を採取した．採取は葉柄あるいは葉の基部をハサミで切断することによって行い，組織内液等の溶出を防ぐために切断面をパラフィンで封じた後，クワ葉およびヤブツバキ葉では750ml，イネ葉では400mlの蒸留水を入れたビーカー内で１時間ゆるく振とうした．振とう後，ガーゼで葉を除去し，ロータリーエバポレーター（約30℃）でそれぞれ50mlおよび10mlに濃縮した後，ミリポアフィルター(0.45μm)で除菌してそれぞれの葉の葉面溶出液とした．これらの溶出液７μl を，上述の方法で調製した７μl の分生子懸濁液にスライドグラス上で添加することにより，発芽に及ぼす影響を調べた．

ｅ　各種植物葉の揮発性成分の捕捉

上述と同様のクワ成葉10g，イネ成葉５gおよびヤブツバキ成葉７gをそれぞれ細断し，直ちに100ml容の三角フラスコ内に入れ，約25℃に静置した．これらの細断葉を入れた三角フラスコを，－20℃のエタノールに下部を浸した三角フラスコとチューブでつなぎ，小型ポンプで両フラスコの空気を循環させた．30分および1時間後に，－20℃のフラスコ内に凍結状態で捕捉された揮発性成分を溶解し，これらの溶解液７μl を７μl の分生子懸濁液にスライドグラス上で添加することにより，揮発性成分の発芽に及ぼす影響を調べた．

ｆ　走査型電子顕微鏡観察試料の作成

温室内で栽培したクワ（品種「しんいちのせ」）の健全葉を約１cm^2に切断し，その表面または裏面に上述の分生子懸濁液を10μl 滴下し，約25℃の湿室内に保持した．1，3，6，9，11，15，18，21，24時間後に，0.1Mリン酸緩衝液（pH6.9）で調製した２％グルタルアルデヒド溶液中に処理葉を浸漬し，約５℃で一晩前固定し，同緩衝液で処理葉を洗浄した．その後，２％オスミウム酸溶液で２～３時間約５℃で後固定し，アルコール系列で脱水後，酢酸イソアミルで置換した．置換後は臨界点乾燥装置（日立HCP-1）で処理葉を乾燥し，イオンスパッタリングによって金粒子を蒸着した．これらの蒸着試料は，走査型電子顕微鏡（日本電子JSM-6301F）を用いて観察し，葉面上に付着した分生子の発芽率および付着器形成率，分生子および付着器の着生部位等を調査した．各区２～３試料を用意し，１試料当り約60個，合計120～180個の分生子について調査した．なお，同様にイネおよびヤブツバキ葉上における本菌分生子の発芽形態も観察した．

ｇ　分生子のクワ葉への侵入時間の推定

分生子がクワ葉への侵入を成立させる時間を調べるため，ネイルエナメル（透明のマニキュア液）処理（Brown, 1975）により検討した．上述と同様の方法で分生子懸濁液を滴下したクワ葉を湿室内に保持し，1，3，6，9，11，15，18，21，24時間後に接種葉をそれぞれ取り出し，葉面上の分生子懸濁液を完全に風乾した後，その分生子懸濁液滴下部を覆うようにネイルエナメルを塗布した．乾固後，ネイルエナメルとそれに付着した分生子，発芽管および付着器をピンセットで丁寧に除去した．この処理をもう一回繰り返した後，接種葉を湿室内に保った．その後，接種葉で病斑形成の有無を調べることによって，菌の侵入が成立する時間を推定した．

(2) 結　果

ａ　発芽に及ぼす諸因子の影響

①分生子の発芽と時間との関係：　分生子の発芽，付着器の形成および発芽管の伸長について経時的変化を調査した．蒸留水に懸濁した分生子は１時間後から発芽が認められ，発芽率は時間の経過とともに増加し，24時間後には約35％となった（Fig. 18）．付着器の形成は6時間後に認められ，15時間後の形成率は80％以上に達した．また，発芽管の長さは時間の経過とともに伸長する傾向が見られた．なお，スライドグラス上での発芽率は，分生子の成熟度等の条件によって振れが見られ，24時間後の調査では約10％から40％までの範囲にあった．

②分生子の発芽に及ぼす各種養分の影響：　M液，MS液および２％スクロース溶液の発芽，付着器の形成および発芽管長に対する影響を調べた．発芽率は蒸留水および２％スクロース溶液中では，それぞれ23％，37％であったのに対し，M液およびMS液中ではそれぞれ84％，80％と高い値を示した．しかし，付着器の形

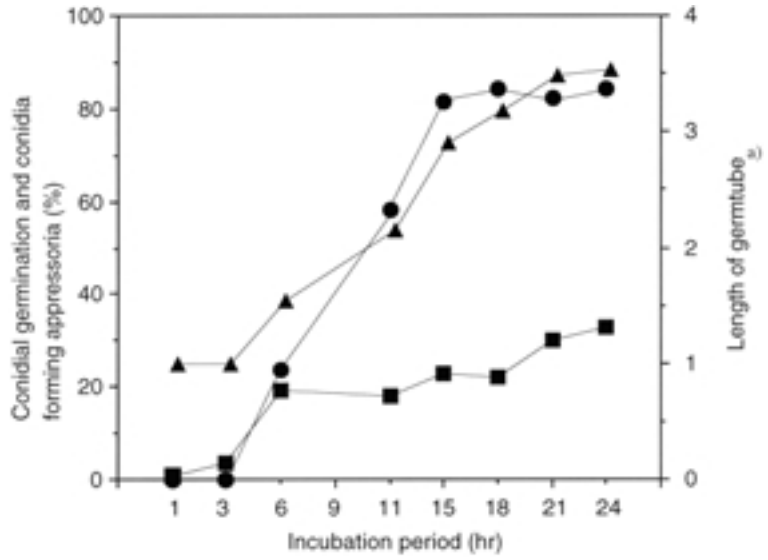

Fig. 18. Conidial germination, appressorial formation and germtube length of *C. dematium* on glass slides at different incubation periods. Conidial suspension was incubated at 25℃ in the dark. a) Each value represents the average of 40-50 determinations. Length of germtubes: 1, under the length of conidia (23-33 μm); 2, 1 to 2-fold of the length of conidia; 3, 2 to 3-fold of the length of conidia; 4, over 3-fold of the length of conidia.■, germination; ●, appressoria; ▲, germtubes.

成率は，蒸留水および２％スクロース溶液ではそれぞれ94％，98％と高かったのに対し，M液およびMS液ではそれぞれ59％，75％と比較的低い値を示した．また，発芽管はM液およびMS液で長くなる傾向が認められた．

③分生子の発芽に及ぼす葉面溶出液の影響：　葉面溶出液の発芽，付着器の形成および発芽管長に対する影響を調べた．付着器の形成率は溶出液と対照の蒸留水との間に明確な差は見られなかった．発芽率はクワ葉面溶出液の添加により顕著な増加が認められた．また，イネ葉およびヤブツバキ葉の葉面溶出液を添加した場合の発芽率もクワの場合と同程度に高い値を示した．しかし，イネの葉面溶出液の添加ではクワの場合とは異なった発芽形態が観察され，特に発芽管が長くなる傾向が見られた（Fig. 19）．また，その形成割合に大きな違いはなかったものの，一つの分生子に形成される付着器は充実が悪く，数も少なくなる傾向が見られた．

④分生子の発芽に及ぼす揮発性成分の影響：　分生子の発芽および付着器の形成に対する揮発性成分の影響を調べた．いずれの植物葉から得られた揮発性成分についても，発芽率は増加し，特にクワ葉からの30分後に捕捉して得られた成分で最も強い発芽誘導活性を示した．しかし，付着器形成率に対して揮発性成分は影響を与えず，発芽形態にも大きな違いは認められなかった．

b　クワ葉上での発芽，付着器形成および組織への侵入

①クワ葉面での発芽率・付着器形成率：　クワ葉面上における分生子の発芽率および付着器形成率を走査型電子顕微鏡で観察した．クワ葉の表面および裏面それぞれについて調べた結果，接種24時間後の発芽率は，表面において91％，裏面においても68％で，いずれもスライドグラス上での発芽と比較して，高い発芽率を示した．付着器形成率は，表面では87％とスライドグラス上での割合とほぼ同じであったのに対し，裏面では64％と形成率がやや低下した．

②クワ葉面上における分生子発芽の経時的変化：分生子のクワ葉面（表面）上での発芽率，付着器形成率および発芽管長が，時間の経過とともにどのように推移するか調べた．発芽率は接種3時間後に74％，６時間後には90％以上に達した（Fig. 20）．付着器形成率も接種３時間後には認められ，６時間後までに急激な増加を示した．発芽管長は接種６時間以降ほぼ一定の長さを保ち，15時間以降ではスライドグラス上での発芽管長と比較して短かった．

③葉面上における発芽分生子の形態：　クワ葉面上の分生子の発芽は片方あるいは両方の先端部付近で起こり（Fig. 21），発芽管先端に付着器が形成された．発芽管の長さは一般に短いが，付着器が形成されない場合には，発芽管が長くなる傾向を示した．また，一部の分生子では，発芽管先端に別の分生子を形成してい

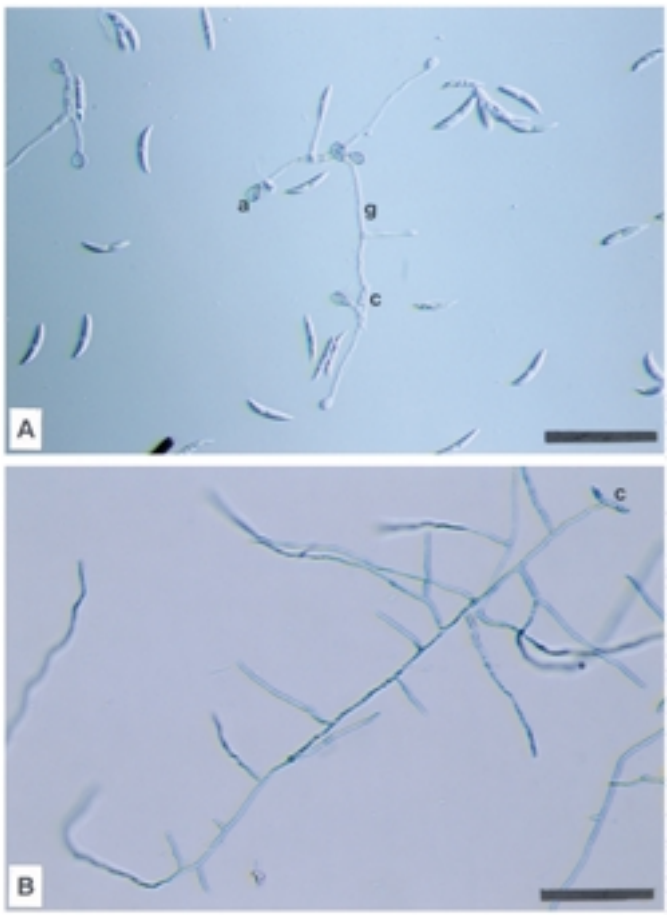

Fig.19. Conidial germination and appressorial formation of *C. dematium* in distilled water (A) and in a solution with water-soluble components from rice leaves (B) on a glass slide 24 hr after incubation. a: appressorium, c: conidium, g: germtube. Bars = 50 μm

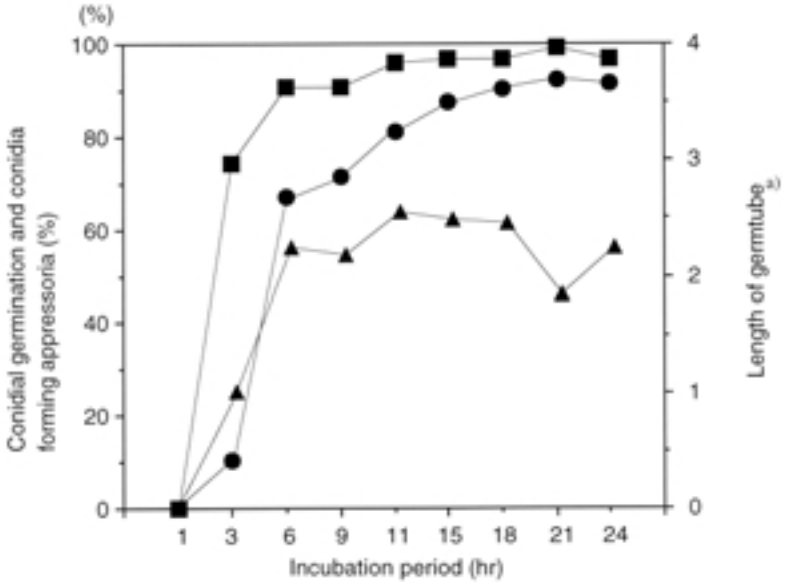

Fig. 20. Conidial germination, appressorial formation and gemtube length of *C. dematium* on mulberry leaves at different incubation periods. Inoculated leaves were incubated at 25 ℃ in the dark. a) Each value represents the average of 40-50 determinations. Length of germtubes: 1, under the length of conidia (23-33 μm); 2, 1 to 2-fold of the length of conidia; 3, 2 to 3-fold of the length of conidia; 4, over 3-fold of the length of conidia. ■, germination; ●, appressoria; ▲, germtubes.

Fig. 21. Conidial germination and appressorial formation of *C. dematium* on a mulberry leaf (cv. Shin-ichinose) 9 hr after inoculation. a: appressorium.

るものも認められた．付着器が形成される位置は，葉の表側ではほとんどが表皮細胞上であったが，裏側では表皮細胞上の他に孔辺細胞上あるいは気孔内部での形成も観察された（Fig. 22）．

非宿主植物であるイネおよびヤブツバキ葉上においても，分生子の発芽は葉の表裏に関係なく認められた．しかし，分生子の形態はクワ葉上とは異なり，イネ葉上では，クワ葉上と同様なものも一部観察されたが大部分は発芽管が異常に長く，付着器もほとんど観察されなかった（Fig. 23）．ヤブツバキ葉上では，典型的な付着器を形成したが，発芽管長はクワ葉上のものと比較して長めであった（Fig. 24）．

④分生子のクワ葉への侵入成立時間：　発芽分生子が葉内へ侵入を成立させる時間を，ネイルエナメル処理により推定した．保持時間が15時間までの接種葉では病斑形成が見られず，18時間以降の接種葉で病斑形成は認められた．また，本菌の侵入は成立しているが，潜在化している場合も考えられたので，本章の３で示した手法により，処理13日後の接種葉の裏面に紫外線を５分間照射して潜在感染を顕在化させた．この処理においても保持時間が15時間までの接種葉では病斑形成が見られなかった．以上のことから，分生子の侵入成立には，接種後15～18時間かかるものと推定された．

なお，接種24時間後にネイルエナメル処理を行った接種葉を走査型電子顕微鏡で観察した結果，分生子，発芽管，付着器の存在は認められず，付着器からクワ葉内に侵入した菌糸（穿孔糸）が剥離されてできたと考えられる直径約0.5μmの穴が見られた（Fig. 25）．また，処理後のネイルエナメルには，分生子，発芽管および付着器が多数付着していた（Fig. 26）．

２．葉中に含まれる分生子形成誘導因子

（1）材料および方法

ａ　乾燥クワ葉からの分生子形成誘導因子の抽出

圃場の健全クワ葉を採取，風乾して得た乾燥葉から分生子形成因子の抽出を試みた．1.5gの乾燥葉を直径2.5cm，高さ5.5cmのガラス製管ビンに入れ，メタノール，アセトン，50％アセトン，または酢酸エチルをそれぞれ20ml入れ，１時間抽出した．その後，抽出液を最終的に蒸留水で５mlに濃縮して，各粗抽出液とした．これらの粗抽出液の分生子形成活性は，本菌分生子の形成がほとんど見られない培地であるPSA平板上で行った．すなわち，本菌をPSAの平板上に移植し，菌叢の直径が２～３cmぐらいに生育した菌叢の先端部に，各粗抽出液を３μl滴下した．滴下後は，25℃のインキュベーター内で４日間明条件下で培養し，その間各粗抽出液滴下部において，分生子形成の有無を調べた．分生子形成の有無は，Fig. 27に示したように，肉眼でも容易に確認できた．

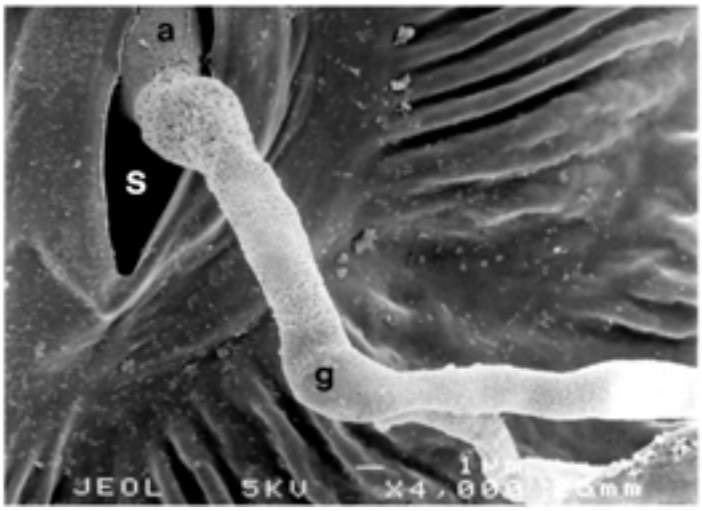

Fig. 22. Appressorium of *C. dematium* formed in a stoma. a: appressorium, g: germtube, s: stoma.

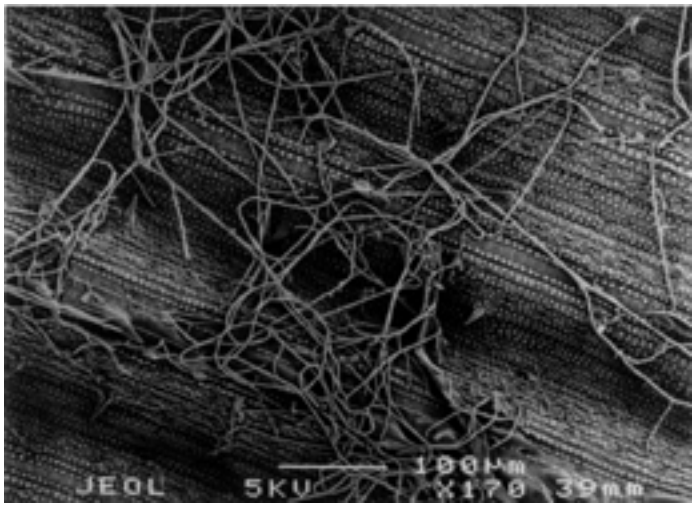

Fig. 23. Conidial germination and appressorial formation of *C. dematium* on a rice leaf （cv. Koshihikari）22hr after inoculation.

b　各種植物乾燥葉の抽出液の分生子形成誘導

Table 18に示した24種の植物乾燥葉を供試し，上述と同様に50％アセトンで抽出後，濃縮して得られた各粗抽出液の分生子形成活性について上述と同様に調べた．

c　クワ葉中に含まれるアミノ酸・ビタミンの分生子形成誘導

クワ葉に含まれる16種のアミノ酸および10種のビタミン（Horie *et al.*, 1985）について，それらの分生子形成活性を調べた．供試したアミノ酸はAsp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg，ビタミンはthiamine, riboflavin, pantothenate, nicotinic acid, pyridoxine, biotin, folic acid, choline, inositol, α-tocopherolであり，それぞれ，１％の懸濁液または混濁液を作成し，上述と同様に本菌の菌叢先端部に３μl滴下し，24時間培養後に分生子の形成を調べた．

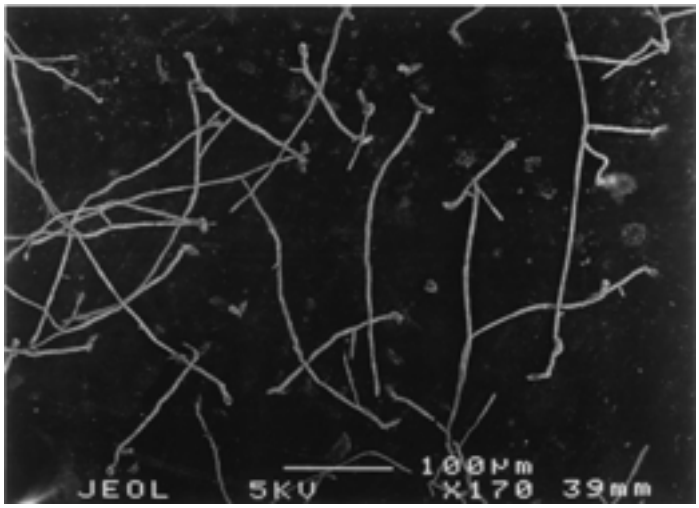

Fig. 24. Conidial germination and appressorial formation of *C. dematium* on a camellia leaf 22hr after inoculation.

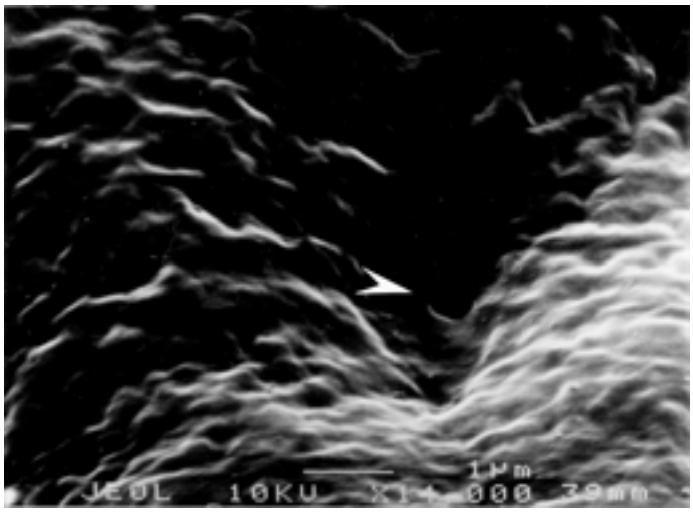

Fig. 25. Hole（arrow）on the mulberry leaf（cv. Shin-ichinose）formed by removing a infection peg of *C. dematium* with clear nail polish. The leaf was treated with a nail polish 24 hr after inoculation.

(2) 結　果

ａ　乾燥クワ葉抽出液の分生子形成誘導

乾燥クワ葉から各種溶媒によって得られた粗抽出液の活性を調べた．50％アセトン抽出液のみに誘導活性が認められ，メタノール，アセトンおよび酢酸エチル抽出液では認められなかった．0～100％の各濃度の含水アセトンによる抽出液の誘導活性を同様に調べた結果，滴下４日後では，0～60％アセトン抽出液で顕著な活性を，70～80％アセトン抽出液では弱い活性を示した．また，６月～８月に作成した葉位の異なるクワ葉およびクワ枝条の乾燥標本から，上述と同様に50％アセトンで抽出して得られた各標本の粗抽出液の誘導活性について検討した．その結果，枝条の木質部以外からの抽出液は，顕著な誘導活性を持つことが明らかとなった．なお，PSA平板上での分生子形成は，滴下16時間後に肉眼で確認できた．また，50％アセトン抽

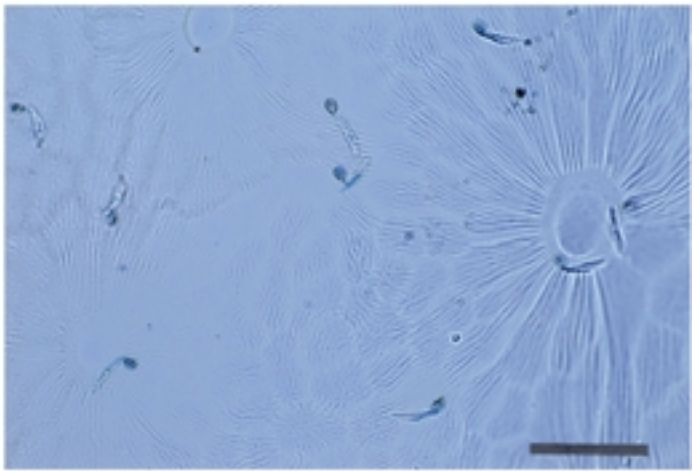

Fig. 26. Germinated conidia of *C. dematium* adhering to a nail polish. Leaf was treated with the nail polish 24 hr after inoculation. Bar = 50 μm.

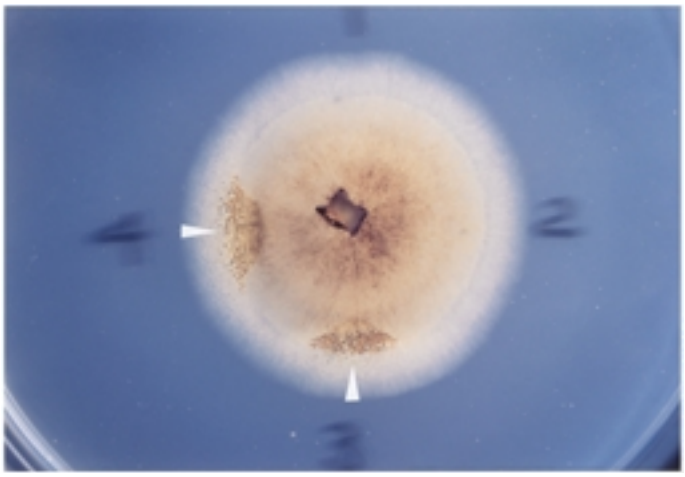

Fig. 27. Sporulation on the mycelial colony of *C. dematium* at the margin (arrows) on PDA plate 24 hr after placing mulberry leaves extracts.

出液をオートクレーブ処理（121℃，20分）した場合でも，誘導活性は処理前のものと変わらなかったことから，粗抽出液中の形成誘導因子は熱安定の物質であると考えられた．この乾燥葉から50％アセトンで抽出した粗抽出液から，目的因子の単離・精製を試みたが，単離には成功しなかった．

b　各種植物乾燥葉の抽出液の分生子形成誘導

各植物葉由来の粗抽出液の形成誘導活性をTable 18に示した．供試した24種の植物葉のうちライラックおよびキャベツ以外の植物葉で誘導活性が見られ，その中でも，クワ，イチゴ，ナスおよびシソの葉で顕著な誘導活性が見られた．

c　クワ葉中に含まれるアミノ酸・ビタミンの分生子形成誘導

クワ葉中に含まれる各種アミノ酸およびビタミンで，分生子形成活性を示したのはbiotin（vitamin H）のみであった．0.001ppm～100ppm濃度のbiotinをPSA平板上の菌叢先端に同様に滴下して，誘導活性を調べた．活

Table 18. Induction of *C. dematium* sporulation by 50% acetone extracts of various plants leaves

Plants [a]	Induction activity [b]
Mulberry	+++
Poplar	++
Apple	++
Lilac	–
Fig	++
Orange	++
Red pine [c]	+
Japanese pear	+
Loquat	+
Peach	++
Cabbage	–
Strawberry	+++
Marigold	++
Taro	+
Salvia	++
Perilla	+++
Watermelon	++
Rice	++
Eggplant	+++
Lupine	++
Eulalia	++
Chinese chives	+
Kudzu-vein	+
Cucumber	+

a) Each plant leaves was dried before extraction. Aqueous solution of each extract was placed at the margin of the colony on PSA plate.
b) Production of acervuli on PSA plate: +++, many; ++, medium; +, little; –, not produced.
c) An antimicrobial activity against *C. dematium* was also observed.

性は0.01ppm以上で見られ，１ppm以上で顕著であった（Fig. 28）．biotin １ppm液について他の６種21菌株の各種炭疽病菌に対する分生子形成活性について同様に検討した．これらの菌株では顕著な誘導活性は見られず，biotinが誘導活性を示したのはクワ炭疽病菌の*C. dematium*だけであった．

３．クワ葉での潜在感染の顕在化

（1）材料および方法

ａ　紫外線照射による病斑誘発

８月に，圃場より採取した見かけ上健全なクワ葉を供試した．これらの葉をクリーンベンチ内の殺菌灯（National GL-15，波長253.7nm）の直下約30cmの距離に置き，葉の裏面に対し，紫外線を１～16分間照射した．照射後は，葉を３～５日間湿室内に保ち，その後葉上に病斑が顕在化してくるかを調べた．

ｂ　葉上における*C. dematium*の紫外線照射による影響

紫外線照射による本菌の病斑の顕在化は，単に葉面上に本菌の分生子または菌糸が存在しており，紫外線照射によって葉が損傷を受けることによってそれらの表生菌が増殖して病斑が出現した可能性が考えられたので，以下の試験を行った．前述と同様にMSAの平板上から*C. dematium* S8901株の分生子懸濁液（10^6個/ml以上）を作成し，クワ葉の裏面に噴霧接種した．接種後は，10分間程風乾し，上述と同様に紫外線を一定時間照射した．照射後は葉を細断し，PSA平板上に置床して本菌の菌糸生育の有無により，生存の有無を確認

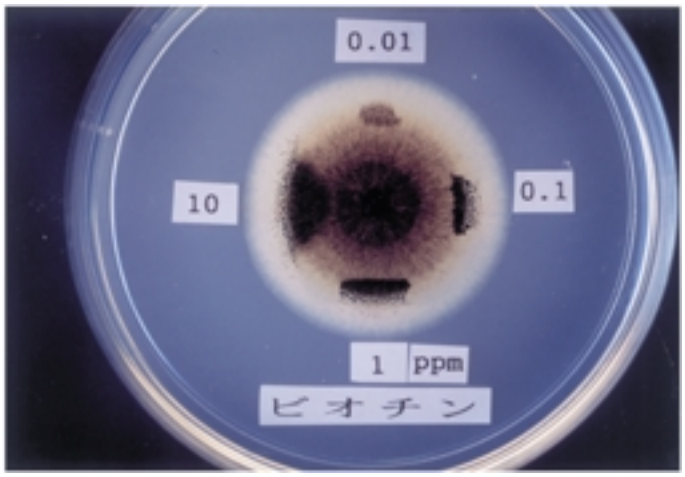

Fig. 28. Sporulation of *C. dematium* on PSA plate by placing each concentrated (0.01 -10 ppm) biotin solution.

し，菌が完全に死滅する照射時間を調べた．

(2) 結　果

ａ　紫外線照射による*C. dematium*の病斑誘発

見かけ上健全なクワ葉の裏面に紫外線を３～５分間照射した結果，葉の表皮は徐々に褐変し，その褐変化に伴い円形の灰褐色斑を多数形成した．これらの誘発斑には分生子層，分生子および剛毛を多数形成し，それらの形態により本菌を*C. dematium*と同定した．また，1, 2, 4, 8, 16分間葉に照射した場合，いずれの葉においても病斑は誘発された．誘発斑は処理２～３日後から認められ，経時的に誘発斑の大きさと数が増し，４～６日後でピークに達した．誘発斑は自然発病の病斑に比べて白色化の傾向を示し，周囲にはハローを作らず，真円に近い形状となった．このため，葉での病斑数も多発して癒合しない限り容易に数えることができた．

ｂ　葉上における*C. dematium*の紫外線照射による影響

葉上に接種した本菌の紫外線照射による影響を調べた．紫外線を45秒間照射した場合，接種した本菌の約90％が死滅し，１～２分の照射では100％死滅した．誘発実験での照射時間は３～５分なので，この場合表面の菌はほぼ死滅しているものと考えられた．さらに，潜在感染葉の両面に10分間ずつ紫外線を照射した場合も，裏面３～５分の照射の場合と同様に誘発斑が出現したことから，病斑形成は葉面の付着分生子および菌糸による可能性は低いと判断した．

ｃ　誘発斑における本菌の分生子形成と病原性

紫外線照射後に誘発された病斑部内の分生子層を顕微鏡下で観察すると，鎌形の分生子が多数形成されており，これらの形態は自然発病部で認められた分生子形態と同じであった．また，接種による病原性試験でも，自然病斑部からの分離菌と同様の病斑を形成した．このことから，葉への紫外線照射は本菌分生子の形態や病原性に影響を与えないことが考えられた．

４．考　察

一般に，糸状菌の胞子（分生子）は重要な伝搬源と考えられ，その発芽形態・生理，またはその形成についての研究は，古くから詳細に行われている．今回，本菌の分生子の発芽について検討を行った結果，分生子の発芽率は，スライドグラス上では低率であったのに対し，クワ葉上では高率であった．糸状菌の発芽を支配する要因としては，光，温度，胞子密度等さまざまなものが知られている（平井ら，1989；冨山ら，1962）が，本菌の分生子発芽にもクワの葉に由来する物理的

あるいは化学的要因が関与していると考えられる．また，本菌の分生子は雨滴で伝搬されることにより新たな感染が起きるが，雨等によりクワ葉面からしみ出てきた成分が，葉面に付着した分生子の発芽を高めていることも考えられる．事実，雨等によりにじみ出た成分が葉面微生物の活動に好都合となる例も知られている（木村，1987）．また，多くの植物は，青葉アルコール等の揮発性成分を大気に放出し，周囲の生態環境にさまざまな影響を及ぼす（畑中，1988）．しかし，植物の揮発性成分の葉面糸状菌の胞子に及ぼす影響については，ほとんど知られていない（Brown，1922）．

こうした観点から，葉表面の水溶性成分である葉面溶出液および揮発性成分に着目し，これらの分生子発芽に及ぼす影響について調べた．両成分ともに分生子の発芽を顕著に誘導したことから，両成分は分生子の発芽誘導因子の１種であることが明らかとなった．しかし，本菌の分生子が病原性を示さないイネおよびヤブツバキ葉より抽出した両成分によっても同程度の発芽誘導が見られたことから，これらに含まれる活性成分はクワ特有の成分ではない可能性も考えられる．なお，今回供試した両成分の濃度の影響については未検討である．非宿主植物由来の成分では，高濃度になると分生子の発芽および付着器の形成を阻害することも考えられ，この点は今後さらに検討を要する．また，上記２成分の他に，乾燥クワ葉からの煎汁液によっても発芽が顕著に誘導されたが，これは発芽と感染成立に関与するのではなく，組織内に感染が成立した後の病斑の拡大等に影響を与えるものと考えられる．

付着器形成に関しては，３種いずれの植物の葉面溶出液および揮発性成分とも，対照との差がほとんど見られず，付着器の形成を誘導する因子はこれらの成分以外にあると考えられる．また乾燥クワ葉の煎汁液に含まれる成分は付着器形成率を低下させた．付着器形成については詳細な研究がなされており（Emmett and Parbery，1975），特に各種炭疽病菌については富栄養条件下では，発芽管が伸長あるいは分枝し続けて付着器形成が抑制され，反対に栄養飢餓の状態の下では促進されることが知られている（Hasselbring，1906）．このような性質は，クワの病原菌である本菌でも同様であると推察される．また，一般に付着器の形成には物理的影響が大きいとする報告があり，クワについても物理的な面からの検討が必要である．

クワ葉上では高率の発芽が認められたが，発芽自体は非宿主植物のイネおよびヤブツバキ葉上でも高率で認められた．このことは，発芽が宿主によって特異的に誘導あるいは抑制を受けていないことを示唆している．しかし，発芽の形態は宿主と非宿主で違いが見られた．すなわち，イネ葉上ではその発芽管が異常に長く，ヤブツバキ葉上でもやや長めの発芽管を持つものが多かった．こうした葉上での形態の違いは葉面溶出液を添加した場合と同様であったことから，発芽形態は，発芽時における葉面の成分に大きく影響されるものと考えられる．こうした形態の変化が感染力や病原力に影響を与えているか否かについては，さらに多くの植物を用いて検討する必要がある．

一般に炭疽病菌の分生子は宿主葉上で発芽し，付着器を形成した後にそこから侵入菌糸を出して宿主内に侵入することが知られている（Bailey *et al.*，1992）．本菌分生子の場合もクワ葉上で同様の経過をとることが明らかとなり，さらに今回ネイルエナメルを用いて侵入の成立時間を調べた結果，好適条件下で接種後15～18時間という比較的早い時期に侵入が成立するものと推察された．

本菌の分生子は野外の葉の病斑上で，分生子層および剛毛とともに多湿条件下で容易に形成される．一方，培地上における本菌分生子の形成はPSAの平板上ではほとんど形成されないのに対し，MSA等のクワ葉煎汁液を含んだ培地では多量に形成される．こうした事実から，クワ葉中に本菌分生子の形成を誘導する因子の存在が示唆された．実際，クワ葉の抽出液には顕著な誘導活性が見られた．この抽出液からの単離・精製はできなかったが，誘導活性はクワ以外の複数の植物葉の抽出液でも見られたこと，さらに，抽出液のオートクレーブ処理によっても失活しなかったことから，抽出液中の誘導因子は，クワ葉に特異的な成分ではなく，熱安定の低分子物質であることが推察された．

そこで，クワ葉中に含まれるアミノ酸およびビタミンに着目し，それらの誘導活性について検討したところ，biotin（vitamin H）にのみ活性が認められた．biotinは，熱安定で穀類，野菜等で１kgあたり数10μg含まれ

（今堀・山川，1984），細菌類の重要な生長因子とされる（志田，1981）．また，古くから糸状菌の胞子形成に有効な物質として知られている（冨山ら，1962；Leaver *et al.*, 1947）．また，biotinは乾燥クワ葉中には１kgあたり約0.6mg含まれていることが知られており（柳川ら，1988），今回の実験において本菌の分生子形成誘導に必要な濃度は0.01ppmであった．すなわち，通常の葉中に含まれるbiotinの含量は，分生子の形成誘導に必要十分である．さらに本物質の諸化学的性質は，上述した葉からの抽出液の予備的な諸性質と合致することからも，葉中に含まれるbiotinが，本菌の分生子形成誘導因子の一つであると考えられた．なお，本菌以外の炭疽病菌６種21菌株に対する本物質の誘導活性は，いずれも見られなかったことから，本菌は炭疽病菌の中でも特異な分生子形成様式を持つ菌である可能性もある．

植物病原糸状菌の中には，宿主に侵入しても発病しやすい条件がくるまで病徴を示さない，いわゆる潜在感染するものが知られている（Muirhead and Deverall, 1981；Verhoeff, 1974）．特に炭疽病では潜在感染が多く認められ（Prusky and Plumbley, 1992），カンキツ類（Brown, 1975），バナナ（Brown and Swinburne, 1980），チャ（河野, 1965），テンサイ（築尾, 1990）等で報告されている．これらの事実から，クワ炭疽病でも潜在感染の可能性が十分考えられていたが，これまで詳細な研究はなく，その感染についても証明されていなかった．紫外線をクワの葉の裏面に照射することにより，本菌の病斑が顕在化することを確認した．これらの顕在化した病斑は，自然病斑と比較して白色化の傾向を示し，真円状となることが多く，内部には分生子層が形成され，それらの形成範囲は同心円上に拡大する傾向が見られたが，やがて病斑内で形成を停止した．顕在化病斑内のある範囲にだけ分生子層の形成が見られた理由としては，①紫外線照射後，観察日までに菌糸がその境界まで伸びた．②無病徴的に感染していた菌糸が，紫外線照射時までにその範囲に到達していた，等が考えられる．また，紫外線照射されたクワ葉は数種類のファイトアレキシンを生成・蓄積することが知られており（白田，1991），誘発斑の大きさや分生子層形成範囲の大きさの決定に関与している可能性もある．

葉面上に接種した本菌は，短時間の紫外線照射によって容易に死滅したことから，照射による病斑形成が葉面の付着分生子による可能性は低いものと考えられる．バナナ炭疽病菌では，付着器が耐性器官としての役割を持ち，昇こうに耐性である（Muirhead and Deverall, 1981）ことから，クワ炭疽病菌の付着器が紫外線照射に対して耐性であることも考えられる．これらのことを考え合わせると，紫外線照射によりクワ葉上で顕在化された病斑は，葉の組織内で無病徴的に感染していた菌糸，または付着器から再発芽した菌糸による可能性が高いと推察される．なお，潜在感染葉の紫外線照射葉片と非照射葉片をPDAの平板上に置いたところ，非照射葉片からは雑菌が多く出現し，そのため本菌の分離は困難であったが，照射葉片からは本菌が優先的に伸長してきたので，分離は容易であった．これは，葉面に生息していた雑菌の多くが紫外線照射により死滅したためと推察される．さらに，紫外線照射により本菌の分生子形態および病原性に変異を誘導しなかったことから，紫外線照射は*C. dematium*の分離法としても有用であると考えられる．

病斑の顕在化を引き起こす紫外線照射の作用機構については現在のところ不明であるが，オオムギ子葉鞘に紫外線を照射すると，うどんこ病菌の感染率が増加する（山岡ら，1989・1990）ことからも，感染や発病を阻害している機構の一部が紫外線により破壊あるいは抑制される可能性も考えられる．しかし，この紫外線照射による病斑誘発の機構については，今後に残された研究課題である．また，紫外線照射による潜在感染誘発法は，各種作物の炭疽病の発生予察等にも応用できる可能性がある．イチゴ炭疽病では潜在感染株を判別することが防除上の最重要事項とされているが，石川ら（1992）はエタノール浸漬法とともに，本法が潜在感染の顕在化に有効であることを明らかにしている．

Ⅷ　クワ炭疽病菌*C. dematium*感染罹病葉中に生産される毒素

*C. dematium*による本病発生において，野外で観察される葉での病徴，特に夏期に形成される病斑では褐変部の周囲にハローを形成することから，本菌はクワ葉

病斑部において毒素を生産して宿主細胞を殺していることが推察される．炭疽病菌で報告されている毒素は，いずれも宿主非特異的毒素で，培養ろ液中から検出されている（Bailey *et al.*，1992）．

本章では，本菌の培地中および罹病部から，健全クワ葉に壊死斑形成を誘導する毒素の抽出を試み，その抽出条件について検討した．また，毒素のクワへの病原性に対する役割について考察を行うとともに，本成分の単離・精製を行い，その物質同定を試みた．

１．罹病葉中での毒素の生産

（1）材料および方法

ａ　クワ葉病斑部からの抽出

圃場で栽培されているクワ品種「しんいちのせ」の健全葉を採取し，前述と同様の手法により，MSAの平板上で培養した*C. dematium* S8901株の菌叢片を葉に有傷接種した．湿室内に７～10日間保持した後，形成した病斑褐変部をはさみで切り取った．その後集めた褐変部を生重１ｇあたり10mlのアセトンに約30分間浸漬し，抽出液を風乾後，蒸留水で病斑部生重１ｇあたり200μlになるように濃縮し，ミリポアフィルター（0.45μm）でろ過した．ろ過液を粗抽出液とし，試験に用いた．対照液として，健全クワ葉から同様に抽出液を作成した．

ｂ　毒性の検定

野外または温室内で栽培した感受性品種「落井」の切り取り葉の10針で２回傷を付けた所に，上述の粗抽出液を10μl滴下した．湿室条件下で２～３日保持した後，葉に対する壊死斑形成の有無および壊死斑の大きさにより抽出液の毒性活性とその程度を調べた．

ｃ　各種培地からの毒素の抽出

本菌を培養した各種培地から得られる抽出液の活性を調べた．培地にはPSA，PDA，MSA，KB（proteose peptone No.３　20g，K_2HPO_4　1.5g，$MgSO_4$　1.5g，グリセリン　10ml，寒天　15g，蒸留水　１ℓ），Richards（KNO_3　10 g，KH_2PO_4　5 g，$MgSO_4$・$7H_2O$　2.5 g，$FeCl_3$　５mg，スクロース　50 g，寒天　18 g，蒸留水　１ℓ）およびCzapek（$NaNO_3$　２g，K_2HPO_4　１g，$MgSO_4$・$7H_2O$　0.5 g，KCl　0.5 g，$FeSO_4$　10 mg，スクロース30 g，寒天　18 g，蒸留水　１ℓ）の平板およびそれぞれから寒天を除去した液体培地を用いた．培養は，液体の場合は300ml容の三角コルベン内に各培地を50ml入れたもの，平板の場合は直径９cmのシャーレに流しこんだものに，本菌の菌叢片を移植後，ともに25℃暗黒条件下で７～14日間静置培養した．試験液は次のように作成した．液体培地の場合は，培養後遠心分離（5000×g）で得られた各上清液を10倍濃縮し，ミリポアフィルター（0.45μm）でろ過した．平板培地の場合は約20mlのアセトンを培地上に流し込み，30分間抽出後，0.5mlに濃縮した液を同様にミリポアフィルターでろ過した．これら各種の試験液を上述と同様に「落井」の葉に有傷滴下した．また，クワ葉をオートクレーブ処理して作成した熱処理葉に本菌を接種し，同条件下で７日間無菌的に培養した葉からのアセトン抽出液も，病斑部からの抽出法と同様の手順で作成し，試験に供試した．なお，本菌を培養しない各培地のみから同様に作成した抽出液を対照液として用いた．

（2）結　果

ａ　病斑部からの抽出溶媒

上述の手法で，アセトンを用いて抽出した結果，健全葉からの粗抽出液では壊死斑形成が見られなかったのに対し，病斑部からの抽出液では，葉脈に沿った顕著な壊死斑形成が見られた（Fig. 29）．各種の抽出溶媒を用いて，最適抽出条件を検討した．上述のクワ葉病斑部を風乾した後に，エーテル，酢酸エチル，n-ブタノール，70％アセトンまたはメタノールを乾燥葉1gあたり25ml入れ，30分間抽出後，１mlに濃縮した各粗抽出液を「落井」の葉に同様に有傷滴下した．その結果，活性は70％アセトンおよびメタノール抽出液で見られ，それ以外の抽出液では見られなかった．また，活性は70％アセトン抽出液でより顕著であったことから，各アセトン濃度での抽出液を「落井」の葉および本粗抽出液に対し感受性を示したモモ葉を用いて検討した結果，クワ葉に対する活性は０～80％アセトン抽出液で認められ，モモ葉に対しては，40～90％アセトン抽出液で活性が認められた．70％アセトン抽出液は，両植

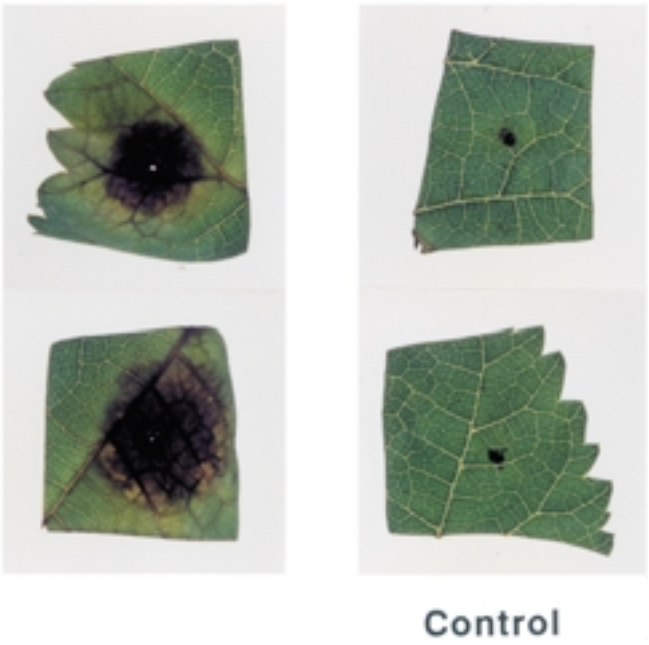

Fig. 29. Necrotic lesions on mulberry leaves (cv. Ochii) appeared 3 days after placing the lesion extract onto the punctured site (left). Acetone extract from healthy mulberry leaves was dropped on each leaf at punctured site, as control. Black points in the center of the leaves correspond to the sites that had been punctured and onto which extract had been dropped.

物葉で比較的高い活性を示した．また，70％アセトン抽出液を100℃で10分間処理しても，壊死斑形成の活性低下は見られなかったことから，活性成分は熱安定性であると考えられた．

b　各種培地からの抽出液の活性

本菌を培養した各種培地中から活性成分を抽出し，壊死斑形成の活性を調べた．いずれの抽出液でもクワ生葉病斑部からの抽出液ほどの活性が見られず，活性の有無に振れがあり，また対照液でも壊死斑を形成する場合があった．しかし，オートクレーブ処理葉に本菌を接種して得られた抽出液は，類似の壊死斑を形成した．

c　接種葉の保持日数

クワ葉において，本菌接種後の保持日数と活性成分の生成量について検討した．後述の単離・精製用の罹病葉の作成法に準じ，本菌を感受性品種「落井」，抵抗性品種「大和早生」および普及奨励品種「しんいちのせ」の切断葉にそれぞれ接種し，25℃の湿室内で保持した．その後経時的に接種葉から上述と同様に抽出液を作成し，活性を調べた．その結果，接種によるクワ葉の褐変は，通常接種２日後に見られるようになり，約６日後ぐらいまでには葉全体が褐変化するが，壊死斑形成の活性もほぼこの褐変程度に従って増加する傾向が見られた．すなわち，活性程度を経時的に見ると，一般に接種２日後から高い活性が見られ，４日後にピークに達し，６～８日後にかけて低下するパターンを示した（Fig. 30）．なお，接種８日後において，「落井」および「しんいちのせ」の接種葉では褐変程度が著しく，葉組織の崩壊が激しかった．

d　炭疽病病斑部各部位における毒性活性

本菌の菌叢片接種により形成された病斑の各部位から得られた抽出液の活性を比較した．複数の病斑部を用い，それぞれ①病斑褐変部，②病斑褐変部と健全部の境界（約５mm幅に切り，ハロー部を含む）部，③境界部の外側の健全部に分けた．各部位を風乾し同じ重さに調整後，上述と同様に70％アセトンで抽出・濃縮し，各抽出液の各段階希釈液を「落井」の葉に有傷滴下し，それぞれの活性を調べた．その結果，褐変部および境界部では，ほぼ同程度の壊死斑形成活性が見られた（Fig. 31）．

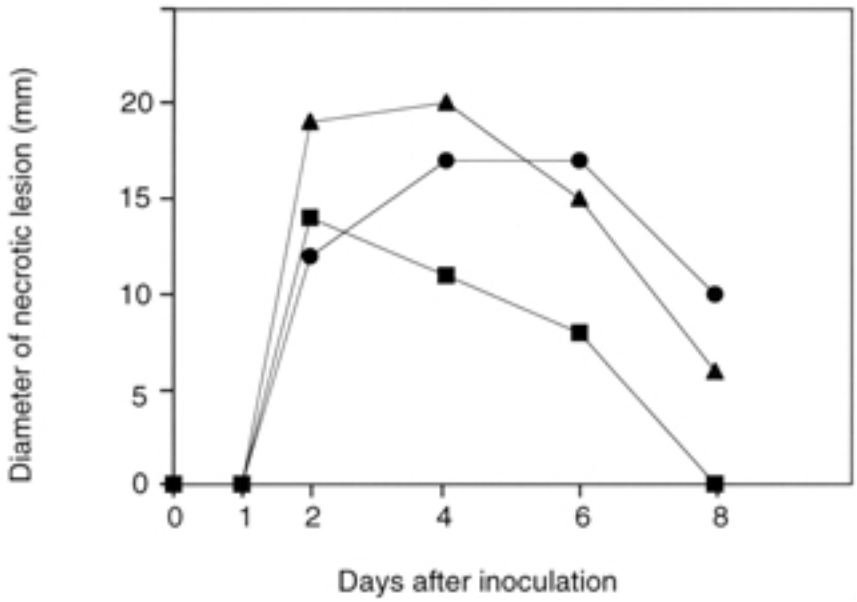

Fig. 30. Toxicity of lesion extracts obtained from each cultivar of inoculated mulberry leaves. Mulberry cultivar: ■, Ochii; ●, Yamatowase; ▲, Shin-ichinose. Cut leaves immersed in conidial suspension of *C. dematium* were incubated in moist chambers at 25 ℃ until extraction.

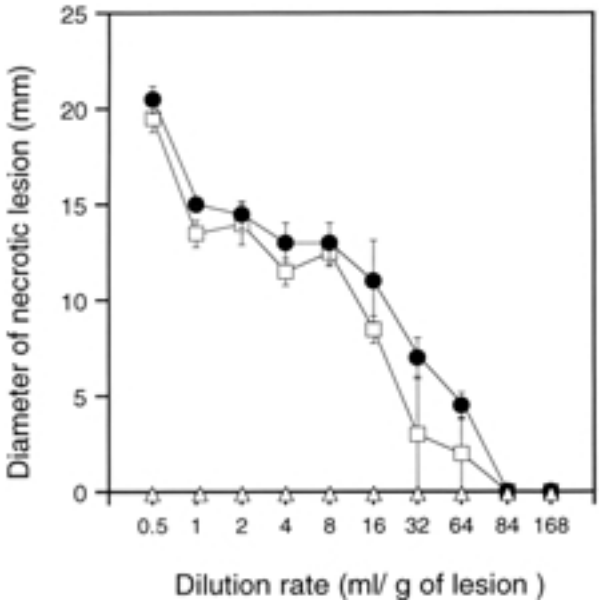

Fig. 31. Toxicity of diluted extract obtained from each part of lesion on mulberry leaves. Each value represents the average of two determinations. Bars represent standard error of the mean. Each extract was diluted with 50 % methanol. Symbols: ●, extract from brown parts of lesions; □, extract from border parts between brown parts and healthy parts; △, extract from healthy parts around lesions.

２．毒素の役割

(1) 材料および方法

ａ　各種植物葉に対する活性

Table 19に示したクワを含む17種の植物の健全切り取り葉を供試し，上述と同様にアセトン粗抽出液を有傷滴下し，壊死斑形成の活性を調べた．

ｂ　クワ各品種葉に対する活性

当研究所内で栽培しているクワ品種のうち，本菌に対して感受性および抵抗性を示す計８品種の切り取り葉を供試し，上述と同様に活性を調べた．感受性品種として「落井」,「長沙」,「彦次郎」および「竜川秋雨」,抵抗性品種として「群馬赤木」,「金子」,「柳田」および「大和早生」を供試し，３月に基部伐採した各品種クワ株の新梢で最大光葉付近に着生している葉を６月に採取し，これらの葉に上述と同様にアセトン粗抽出液を有傷滴下した．さらに，同時に前述と同様に作成した本菌の分生子懸濁液（2×10^6個/ml）も有傷滴下（10μl）し，各葉の本菌に対する感受性を確認した．

Table 19. Toxicity of the lesion extract on various plants leaves

Plants[a]	Extract[b]		Control[c]	
Soybean	+[d]	+	–	–
Japanease pear	+	+	–	–
Green pepper	–	–	–	–
Maple tree	+	+	–	–
Cucumber	–	–	–	–
Eggplant	+	+	–	–
Liriodendron	++	++	–	–
Peach	+++	+++	(+)	–
Yulan	+	+	–	–
Kudzu-vein	+++	+++	(+)	(+)
Mulberry (cv. Ochii)	+++	+++	–	–
Mulberry (Shimaguwa)	+	+	–	–
Paper-mulberry	–	–	–	–
Silkworm-thorn	–	–	–	–
Fig	–	–	–	–
Chinese cabbage	+	+	–	–
Japanese radish	+++	+++	–	–

a) Detached leaves were used in the experiment.
b) 10 µl of acetone extract from anthracnose lesions was placed on each leaf at the punctured site.
c) 10 µl of acetone extract from healthy mulberry leaves was placed on each leaf at the punctured site.
d) Observation was performed 6 days after placing the extract. Diameter of necrotic lesion: –, no; (+), less than 5 mm; +, 5-6 mm; ++,7-9 mm; +++, over 10 mm.

(2) 結　果

ａ　各種植物葉に対する活性

アセトン粗抽出液の各植物葉に対する活性を調べた結果，壊死斑形成の認められた植物はクワ以外には，ダイズ，ナシ，ユリノキ，モモ，ハクモクレン，クズ，ハクサイ，ダイコン等であり，特に，モモ，クズ，ダイコン葉で顕著であった（Table 19）．

ｂ　クワ各品種葉に対する活性

本菌に感受性または抵抗性を示す計８品種に対するアセトン抽出液の活性を調べた．壊死斑形成の程度は，感受性品種と抵抗性品種間で明らかに異なっていた（Fig. 32）．抵抗性品種における壊死斑の大きさは，感受性品種のものに比べ，いずれも小型であった．また，本菌分生子に対する各品種の感受性程度も，壊死斑形成程度とほぼ同様であった．分生子接種において，抵抗性品種では病斑の形成は認められなかったが，前章の３の手法により，葉の裏面に紫外線を照射すると，いずれの品種でもごく小型（直径が３～６mm）の病斑が形成され，本菌が潜在的に感染していた．

３．感染に関与する毒素の単離・精製

(1) 材料および方法

ａ　抽出材料の大量作成および抽出

毒素の化学構造を明らかにするために，以下の方法により病斑部試料を大量に調製し，毒性成分の単離・精製を試みた．圃場より「しんいちのせ」の健全葉を採取し，８～12cm^{2}に切断した．それらの切断葉を前述と同様に作成した本菌分生子懸濁液（約10^{6}個/ml）に浸漬し，余分な水分を除去した後，湿室条件下に保持した．保持３～６日後に病斑形成を確認後，これらの罹病葉を湿室から取り出し，抽出操作を行うまで－30℃のフリーザーで保存した．抽出は，罹病葉の生重約３kg（乾燥重で約650g相当）に対して21 ℓ のアセトンを用いて約1時間行い，これを粗抽出液とし，以下の活性成分の単離・精製に供試した．

ｂ　活性成分の検出

各精製段階において活性成分を追跡するために，上述と同様に「落井」の健全葉に，50％メタノールを用いて所定濃度に希釈した各試験液を有傷滴下した．そ

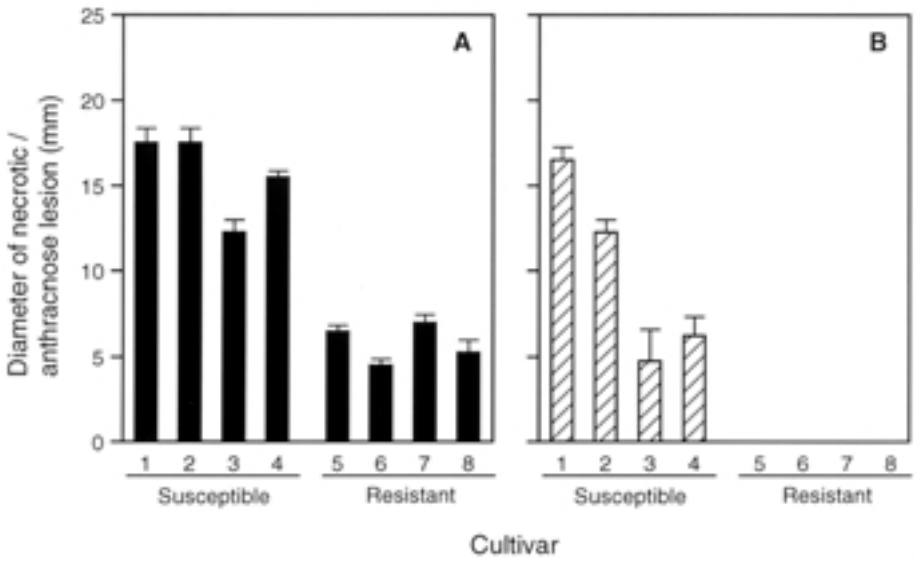

Fig. 32. Toxicity of lesion extract and lesion formation by the inoculation with a conidial suspension of *C. dematium* on leaves of mulberry for each cultivar. [A] Necrotic lesion formed by placing a drop of the lesion extract. [B] Anthracnose lesion formed by the inoculation of a conidial suspension. Ten μl of the extract or conidial suspension was placed on each leaf at the punctured site, and observations were performed 3 or 7 days after placing, respectively. Mulberry cultivar: 1, Ochii; 2, Chyousa; 3, Hikojirou; 4, Ryuusenushuu; 5, Kaneko; 6, Gunmaakagi; 7, Yanagida; 8, Yamatowase. Each value represents the average of four determinations. Bars represent standard error of the mean.

の後，滴下部における壊死斑形成の有無およびその大きさにより，活性の有無および程度を調べた．

c　分析機器

高速液体クロマトグラフィーは，Waters社製の626ポンプおよび600Sシステムコントローラーを用い，検出器は，同社製の996 Photodiodo array detecterを用いた．カラムは，Shodex C18-5B（4.6×250 mm）またはShodex PH-5B（4.6×250 mm）を用い，カラム温度40℃，流量1ml/分として分離を行った．NMR測定は，日本電子製JNM A600 FT-NMR Systemで，高速原子衝撃質量分析（FAB-MS）は，日本電子製JNS SX 120Aを用いて行った．

(2) 結　果

a　活性成分の単離・精製

病斑部より得られたアセトン粗抽出液から，活性成分を単離・精製するためのスキームをFig. 33に示した．500mlの粗抽出液を，水に転溶後，n-ヘキサンで分配した．水相は希塩酸によりpHを2.3に調整後，酢酸エチルで分配したのち，常法により酸性画分と中性画分に分別した．その後，各画分ともにシリカゲル（和光純薬，C-200，クロロホルム／メタノール系）次いで化学修飾型シリカゲル（Varian Analytichem，Bondesil C18 PART 1221-3012，水／メタノール系）を用いたカラムクロマトグラフィーにより分画した．得られた活性画分は，分取HPLC（水／メタノール／酢酸系，または水／アセトニトリル系）に供試し，最終的に４種類（Fig. 33中A～D）の活性画分を単一ピークとして単離した．精製された各活性成分量は，いずれも0.1mg以下と微量であった．

b　単離した活性成分の化学的性質

単離した活性成分A～DのNMRおよびFAB-MSによる構造解析を試みたが，いずれの試料も微量であったことから，スペクトルの帰属および構造決定には至らなかった．しかしながら，いずれの活性成分についても^{1}H-NMRスペクトルは弱いながらも観測されており，若干の構造情報が得られた．活性成分Aでは，1.0ppm付近にメチルプロトン（triplet），1.3ppm付近にメチレンプロトン，7.2ppm付近に二重結合炭素に直結したプロ

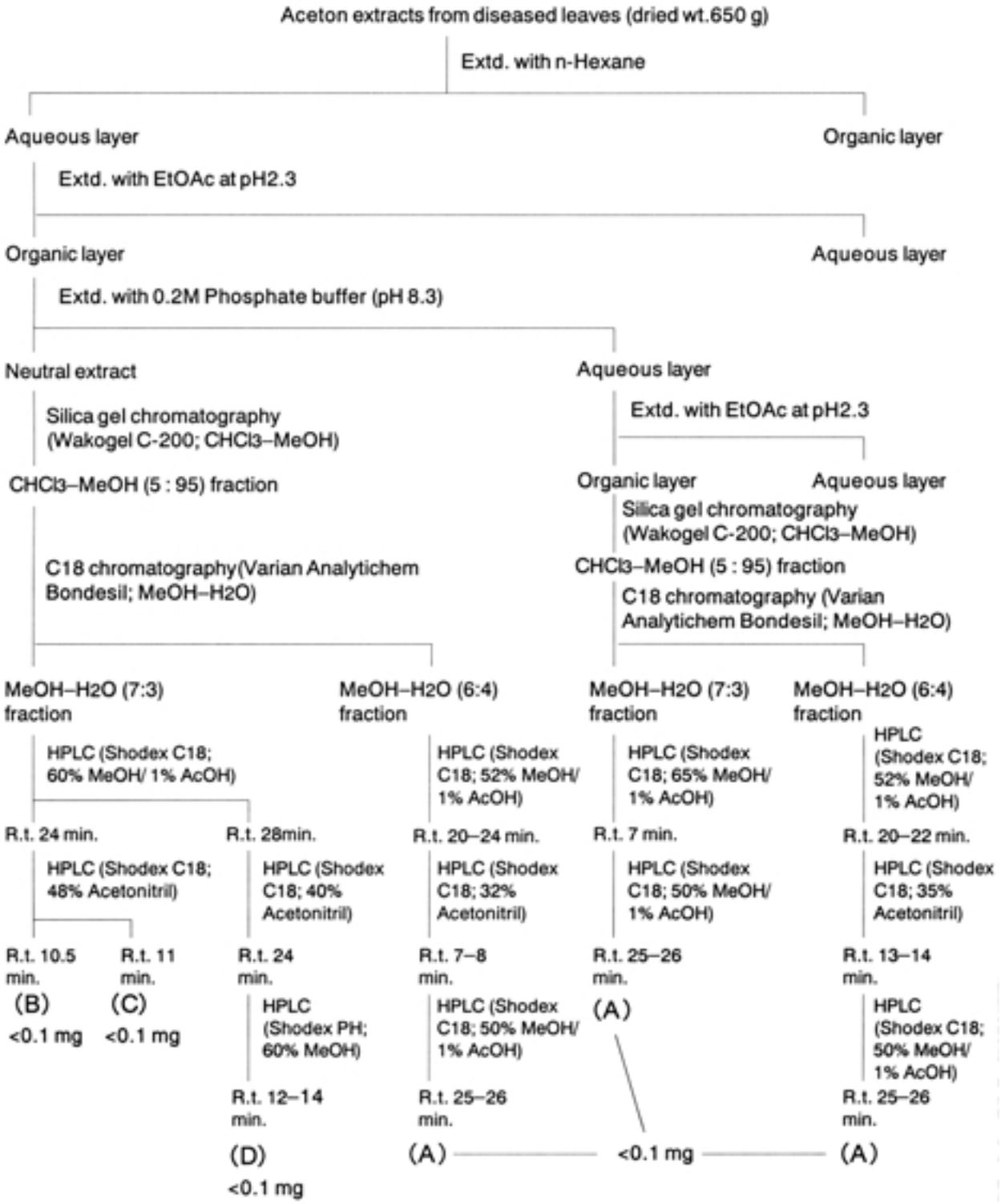

Fig. 33. Isolation procedures of toxic compounds（A-D）from anthracnose lesions on mulberry leaves produced by *C. dematium*.

トンなどが観測された．一方，活性成分ＢとＣの^{1}H-NMRスペクトルは良く類似しており，いずれも1.1, 1.3, 1.7, 1.8, 2.3, 7.2ppm付近にシグナルが観測された．また，活性成分Ｄにおいては，ピーク強度はごく弱いものの，0.85～0.98のメチルプロトン（multiplet），1.3ppm付近のメチレンプロトン，1.7および2.1ppm付近の各シグナルが観測された．現時点でこれら化学構造について断定できないが，活性成分Ａ～Ｃは^{1}H-NMRスペクトルによりベンゼン環を持っていると考えられるのに対し，活性成分Ｄはベンゼン環は持っておらずカルボキシル基を持つことが推測された．

成分Ａ～Ｄの特性として，いずれの成分も特徴的なUV吸収スペクトルを持っていることが挙げられた．各成分のUV吸収スペクトルはFig. 34に示した．いずれの成分も，271nm, 323nm, 369nm付近に大きな吸収ピークを持つ蛍光物質であった．

４．考　察

本病菌の接種により形成されたクワ葉病斑部では，健全クワ葉に壊死斑の形成を誘導する成分（毒素）が生産されていることが明らかとなった．また，本菌を培養した培地中では，同様の壊死斑形成を誘導する成分はほとんど生産されないことが明らかとなった．中には稀に，壊死斑を形成した場合もあったが，その大きさは小さく，壊死斑の形態も若干異なり，さらに対照液でも形成が認められる場合があった．これらのことからも，培地中で壊死斑形成を誘導した因子は，病斑からの抽出液中に含まれる活性因子とは異なる可能性が高いと考えられる．しかしながら，オートクレーブ処理葉に本病菌を接種して得られた抽出液では類似の壊死斑を形成することが認められた．この結果から，病斑部から抽出される毒性成分は，ファイトアレキシン等の菌の感染による植物側の抵抗反応産物ではなく，病原菌の二次代謝産物であると考えられる．また，今回の罹病葉病斑部から抽出された活性成分は，クワの葉中で容易にあるいは特異的に生産されると考えられる．さらに，本活性成分の生産誘導と生合成経路については今後の検討課題であるが，クワ葉中に存在あるいは誘導された成分（乾燥クワ葉の煎汁中には無いか

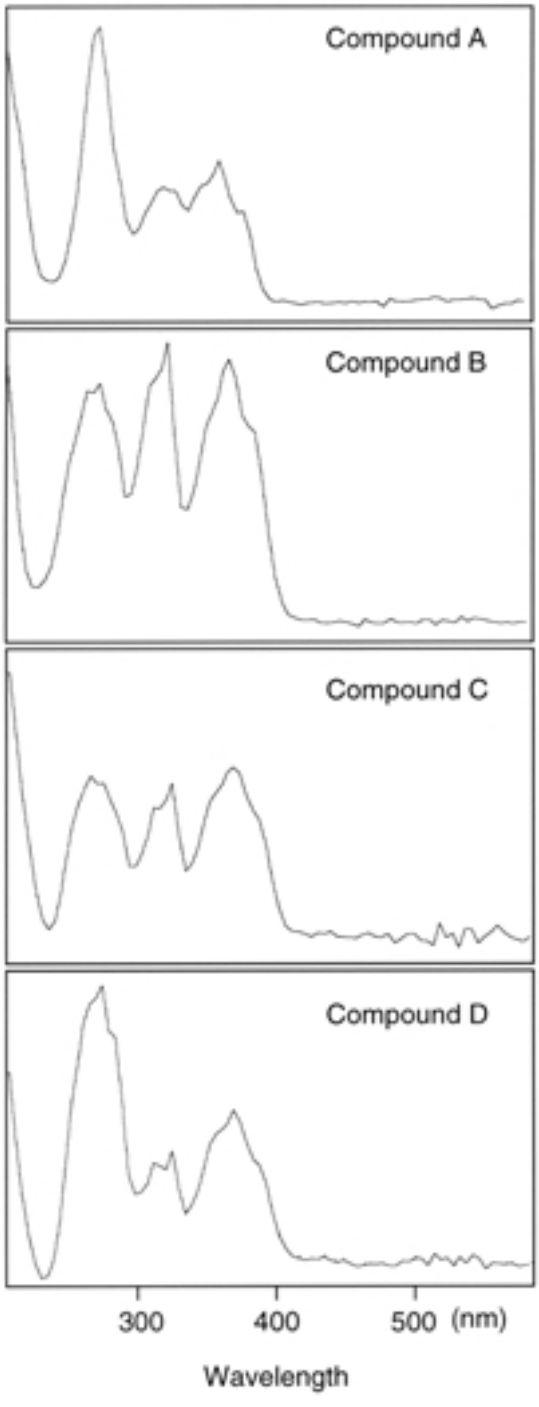

Fig. 34. Ultra violet absorption spectra of toxic compounds from anthracnose lesions on mulberry leaves. The spectra were detected with photodiode array detector on HPLC separation. Solvents: compound A, H_2O: MeOH: AcOH (49: 50: 1); compound B and C, H_2O: Acetonitoril (52: 48); compound D, H_2O: Acetonitoril (60: 40).

少ない成分）が前駆体あるいは生産誘導因子となっていることが，一つの可能性として考えられる．

病原性に関与する植物病原菌の毒素については，Dimmond and Waggoner（1953）は，疾病誘起因子としてvivo toxins（生体内毒素）という呼称で提案した．この定義は，①罹病植物から常に分離され，②純化され，③その処理により少なくとも病徴の一部を再現できるもの，であるとしている（大内，1990）．その後，その概念は認められたものの，広く用いられるには至らず，現在ではこの概念の延長として，病原性に関与する毒素（pathotoxin）を，病原性決定因子となる宿主特異的毒素（host-specific toxin）と，病徴発現に何らかの形で関与する二次的因子（host-nonspecific toxin）に分けて考えられるようになっている（西村，1970；大内，1990）．今回，本活性成分のクワ葉における生産は，２日後から見られはじめ，褐変程度が大きくなると同時に活性も高まる傾向が見られた．一方，本菌は接種１日後には，葉内に侵入を成立させているものと考えられることから，本活性成分は，菌が葉内へ侵入し，増殖後の病斑形成時に多く生産され，病斑の拡大に伴い生産されつづけることが考えられる．また，本菌接種により形成されたクワ葉病斑部の各部位別，すなわち，①病斑の褐変部，②病斑褐変部と健全部の境界部，③境界部の外側の健全部，に分けてそれぞれの抽出液の活性程度について検討した結果，①と②でほぼ同程度の壊死斑形成活性を有しており，褐変斑の先端部でも活性成分が生産されていることが示唆された．これらのことから，本活性成分は，本病の病斑形成・拡大因子としての役割を持っていると考えられる．

本活性成分の各種植物葉に対する活性スペクトルについて検討した結果，本菌の分生子接種による各種植物葉への病原性およびその程度とは必ずしも一致しなかった．このことは，本活性成分が，他の炭疽病菌で生産が報告されている各種毒素（Ballio *et al.*，1969；Gohbara *et al.*，1976；Gohbara *et al.*，1978；Grove *et al.*，1966；Ohra *et al.*，1995）等と同様に 宿主非特異的毒素（host-nonspecific toxin）であることを示唆するものである．しかし，本菌に感受性または抵抗性を示すクワ品種に対して，本活性成分の活性程度を比較した結果，感受性品種と抵抗性品種では，明らかにその活性程度に差が見られ，感受性品種に対しては，大型の壊死斑が形成された．このことから，本活性成分はクワ葉に対しては病斑形成または拡大に関与する病原性因子としての役割を持つことが改めて推察される．

クワ罹病葉からの活性成分の単離・精製を行った結果，４つの活性成分（Ａ～Ｄ）が得られた．今回，これらの成分の収量は極めて微量であったことから，同定することはできなかったが，いずれの成分も特徴的なUV吸収スペクトルを示す低分子の蛍光物質であることが明らかとなった．なお，本活性成分をクワ葉に有傷滴下した後に形成された壊死斑に波長366nmの紫外線を照射すると，葉脈に沿った強い青色の蛍光斑が観察され，さらに本菌接種により形成された病斑部に同様に照射すると，褐変部およびその周縁部，特に後者で強い蛍光を発するのが確認されている．また，単離されたこれら４種の活性成分はいずれも微量であり，いずれも0.1mg以下であった．今回供試した罹病葉は乾燥重相当で約650gであったことから，それぞれの活性成分は，罹病部中では0.154 ppm未満で存在していたことになる．こうしたことから，これらの成分の持つ壊死斑形成活性は極めて強く，実際の病斑上でもごく微量で活性を示すことが考えられる．

以上の結果より，罹病葉中で生産される本毒素は，４種の低分子の化合物で微量ではあるが，本病の病斑形成・拡大を支配する因子として本菌の病原性に関与していることが明らかとなった．

Ⅸ　クワ炭疽病菌 *C. dematium* の生物的防除

本病菌の防除手段としては，他の葉枯性病害との同時防除を兼ねたチオファネートメチル剤の散布が行われている（木村，1979）．しかし，近年，化学薬剤だけに頼らない新たな防除技術の確立が指向されており，本病においても，人体や耕地生態系への影響等から化学薬剤以外の防除手段の開発が望まれている．このような要望に合った環境に優しい防除技術として，微生物の拮抗現象を利用した生物的防除が，様々な作物に導入されている（Furuya *et al.*, 1991；Cooksey and Moore, 1980；Iyozumi *et al.*，1996；Elad *et al.*，1994）．

本章では，本病の生物的防除技術の確立を目指して，

本病菌に対する拮抗微生物，特に*Bacillus*属の拮抗細菌に着目してその検索を試み，拮抗細菌RC-2株の同定，抗菌成分生産のための最適培養条件，抗菌成分の活性スペクトル，抗菌成分のクワ葉上での*C. dematium*に対する防除効果，抗菌成分の単離・精製およびその同定について検討した．

１．拮抗細菌の分離と同定

(1) 材料および方法

ａ　培　地

試験に供試した培地は，①PSA，②PDA，③KB，④LB（バクトトリプトン　10g，イースト抽出物　５g，NaCl　10g，寒天　18g，蒸留水　１ℓ），⑤0.5％ペプトン含有PDA（0.5％PPD：ジャガイモ　200g，グルコース　20g，ペプトン　５g，寒天　18g，蒸留水　１ℓ）及び⑥ジャガイモ半合成（ジャガイモ　300g，$Ca(NO_3)_2$・$4H_2O$　0.5g，Na_2HPO_4・$12H_2O$　２g，ペプトン　５g，スクロース　15g，寒天　18g，蒸留水　１ℓ）培地とし，さらにそれぞれから寒天を除去した液体培地も用いた．

ｂ　細菌の分離

*C. dematium*に対する拮抗細菌の分離源として，圃場のクワに着生している健全葉を10月に採取して用いた．これらの葉を細断し，常法に従い調製したクワ葉磨砕希釈液をジャガイモ半合成培地およびPSAの平板上に塗抹した．今回は*Bacillus*属細菌の分離を目的としたので，多くの他属の細菌及び糸状菌の生育が困難とされる比較的高温の40℃で，１～２日間暗黒環境下で培養することによりコロニーを形成させた．

ｃ　拮抗細菌の選抜

培地上に形成されたコロニーから，常法により細菌を単コロニーとして分離した．得られた各分離菌株を，PSAの平板上でクワ炭疽病菌*C. dematium* S8901株の菌叢片とともに対峙培養を行い，*C. dematium*の生育を阻害した菌株のみを一次選抜した．これらの選抜菌株を10mlのPS液体培地を入れた100ml容の三角コルベン内に移植し，室内環境下で２日間振とう培養（100 rpm）した．得られた培養液を本葉が３～４枚展開したクワ実生苗ポット（品種「一ノ瀬」）に筆で植物体全体に塗布し，風乾後前述のように作成した*C. dematium*の分生子懸濁液（約5×10^5個/ml）を植物体全体に噴霧接種した．接種苗は湿室内で３日間保持し，その後は室内で管理し，苗の葉および苗全体に出現した褐変程度により，本菌による発病を抑制した菌株を二次選抜した．

ｄ　拮抗細菌の同定

選抜した細菌の同定は，api 50 CHB細菌同定キット（bio Merieux S. A.，フランス）を用い，得られたプロファイルを基にapi identification programにより行った．

(2) 結　果

ａ　拮抗細菌の分離

上述の手法により，計17菌株が本菌の拮抗細菌として一次選抜され，その中で，最も強い抗菌活性を示す菌株としてRC-2株（Fig. 35）を選抜した．本菌株の培養的性質，顕微鏡観察および常法によるグラム染色試験から，本菌株はグラム陽性の芽胞形成好気性桿菌であることが明らかとなった．

ｂ　RC-2株の同定

api 50 CHB細菌同定キットにより，本菌株の資化性を調べた結果，各テスト項目の中で陽性反応を示した項目は，Glycerol, L-Arabinose, Ribose, D-Xylose, Glucose, Fructose, Mannose, Inositol, Mannitol, αMethyl-D-glucoside, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Lactose, Melibiose, Sucrose, Trehalose, Raffinose, Starch, Glycogen, Gentiobiose, D-Turanoseであり，このデータから同定確率（% ID）82.5%，T index 0.85で，本菌株は*Bacillus amyloliquefaciens*と同定された．なお，*B. amyloliquefaciens*は*B. subtilis*に類似した種とされ，両種は，DNAのGC含量の違いにより区分されている（Welker and Campbel，1967；Sneath，1986）．

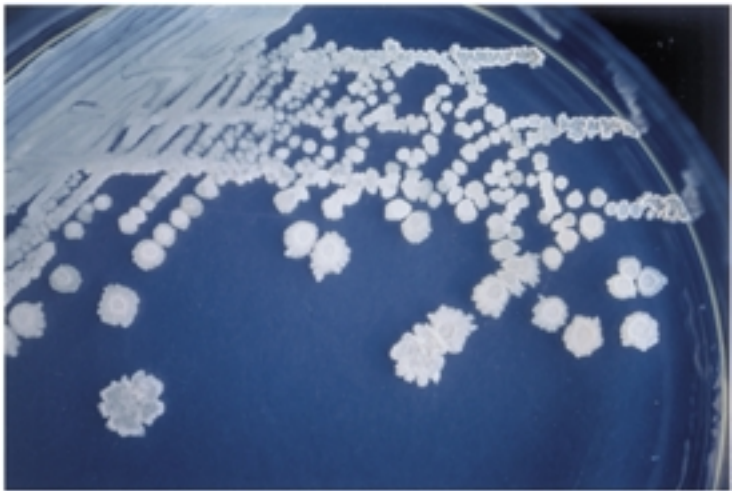

Fig. 35. Colonies of *B. amyloliquefaciens* RC-2 on LB plate after 2 days of incubation.

２．拮抗細菌の培養液による生物的防除

(1) 材料および方法

ａ　RC-2株の抗菌成分の生産

RC-2株の抗菌成分の生産を調べるために，以下の試験を行った．100ml容の三角コルベンに10mlのPS液体培地を入れ，RC-2株を移植後室内環境下で２日間振とう培養（100 rpm）した．その後培養液の一部を取り，遠心分離（3000×g，10分）により培養上清を回収した．また，沈澱した菌体については蒸留水で２回遠心分離で洗浄後，取り出した培養上清と等量の蒸留水に懸濁して，菌体液とした．得られた培養上清，菌体液および未分別の培養液を，上述と同様にクワ実生苗ポットにそれぞれ塗布し，風乾後上述と同様に作成した*C. dematium* S8901株の分生子懸濁液（約５×10^5個/ml）を噴霧接種した．接種苗は湿室内に５日間保持し，その後は室内で管理し，苗の葉に出現した発病葉の割合により，各検定液の発病抑制活性を求めた．

ｂ　抗菌成分の活性スペクトル

①被検定菌：　各種植物病原微生物に対する活性を調べるため，Table 20に示す植物病原細菌９種および，植物病原糸状菌10種を供試した．細菌の場合は，55℃のジャガイモ半合成培地約10mlと，約10^9cfu/mlに調整した細菌懸濁液２mlとを均一に混合して直径９cmのシャーレに流し込み，細菌を混合させた平板培地を作成した．その後，内径５mmのペニシリンカップを４個均等に各培地上に置いた．また，糸状菌の場合は，各菌の菌叢小片（0.5～１mm^3）をPSAの平板上に置床して検定用培地を作成した．

②培養上清の調製および検定方法：　RC-2株を0.5％PPD液で上述と同様に２日間振とう培養して得られた培養上清を，ミリポアフィルター（0.45μm）でろ過して無菌液を作成した．この無菌液の滅菌水による段階希釈液20μlを細菌混合培地上の各カップ内およびPSA上の各菌叢小片上に滴下した．無菌液の抗菌活性は，細菌に対しては25℃で１日培養後に滴下部に出現する阻止円直径で判定し，糸状菌に対しては，25℃で３日培養後に生長した菌叢直径で判定した．

ｃ　*C. dematium*に対する発病抑制効果

①切り取り葉試験：　温室で栽培した品種「しんいちのせ」の健全葉を採取し，約２cm角に切断した．それらの葉の表面に，50mlの0.5％PPD液を入れた300 ml容の三角コルベン内で25℃で２日間振とう培養（130 rpm）後に遠心分離（8000×g，５分）して得られたRC-2株の培養上清の段階希釈液を塗付した．塗付面を風乾後，*C. dematium* S8901株の分生子懸濁液（約10^6個/ml）を葉の表面に10μl滴下接種した．接種後は処理葉を湿室内に８日間保持し，各葉での病斑形成の有無を調査

Table 20. Antimicrobial activity of culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* RC-2

Microorganisms	Dilution of culture filtrate (-fold)[a]			
	1	2	4	Control[b]
Bacteria				
Agrobacterium tumefaciens	26.7[c]	22.7	19.7	NI
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	12.0	7.3	5.3	NI
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*	16.0	13.3	9.3	NI
Pseudomonas chichori	7.7	2.7	NI	NI
Pseudomonas marginalis pv. *marginalis*	9.0	5.3	NI	NI
Pseudomonas syringae pv. *mori*	13.0	6.7	NI	NI
Pseudomonas tolaasii	7.7	4.3	NI	NI
Pseudomonas viridiflava	10.7	6.3	NI	NI
Xanthomonas campestris pv. *campestris*	25.0	21.0	16.3	NI
Fungi				
Bipolaris leersiae	NG[d]	NG	3.0	34.3
Colletotrichum acutatum	NG	NG	5.0	30.3
Colletotrichum dematium	NG	NG	NG	20.3
Diaporthe nomurai	NG	NG	1.7	29.7
Fusarium lateritium f.sp. *mori*	2.0	7.0	15.0	23.7
Glomerella cingulata	NG	NG	NG	40.3
Myrothecium roridum	NG	1.0	10.7	15.0
Pyricularia oryzae	NG	NG	NG	18.3
Rosellinia necatrix	NG	NG	NG	23.7
Sclerotinia sclerotiorum	NG	NG	13.7	>90.0

a) Culture filtrate obtained from an incubation mixture of 0.5%PPD broth was filter-sterilized. An undiluted filtrate was regarded as 1-fold. 20 µl of each dilution was placed on each bacterial layer or mycelial block.
b) Sterilized distilled water (20 µl) was placed as control.
c) Diameter (mm) of inhibition zone: NI, no inhibition. Activity was determined 1 day after placing filtrate. Each value is the mean of three replicates.
d) Diameter (mm) of mycelial growth : NG, no growth. Activity was determined 3 days after placing filtrate. Each value is the mean of three replicates.

した．また，同時にS8901株の分生子発芽に対する影響についても調べた．分生子懸濁液（約10^6個/ml）10μlと対照区の発芽率を高めるためにⅦ章の1で作成したクワ葉面溶出液５μlをホールスライドに滴下後，上記のRC-2株の培養上清の段階希釈液（対照区は蒸留水）を10μl滴下した．その後25℃の湿室内で20時間保持し，それぞれ約200個の分生子についての発芽率を計測し，２反復の平均値を各処理における発芽率とした．

次に，培養上清の処理時期別による発病抑制効果について調べた．上述と同様に「しんいちのせ」の切断葉の表面にS8901株の分生子懸濁液（約10^6個/ml）を10μl滴下接種した．また，菌接種の３，２，１日前，当日および１日後にRC-2株の上記の培養上清を切断葉表面に筆で塗付した．試験期間中はいずれの処理葉も湿室中で保持し，病原菌の接種６日後に各処理葉での病斑形成を調べた．

②ポット試験：　品種「しんいちのせ」の接ぎ木苗を5000分の1aのワグネルポットに定植し，温室内での管理・育成により本葉が約15枚程度展開した苗を供試クワとして用いた．これらのクワの葉面に，上記のRC-2株の培養上清を炭疽病菌の接種11，3，2，1日前および当日に各クワポットあたり１枚ずつ同様に塗付し，室内に保持した．なお，病原菌の接種は上述と同様の手法で，S8901株の分生子懸濁液（約10^6個/ml）を含んだ直径８mmの円形ろ紙を無傷部に置くことにより行った．接種後はポットを約25℃の湿室内に６日間保持し，その後２日間室内で管理後，各処理葉での病斑形成を調べた．

(2) 結　果

ａ　RC-2株の抗菌成分の生産

B. amyloliquefaciens RC-2株の培養液を菌体および培養上清とに分け，それぞれのクワ実生苗での*C. dematium*に対する発病抑制活性を調べた．未分別の培養液および培養上清で顕著な発病抑制効果が見られたのに対し，菌体の懸濁液では効果は認められなかった．このことから，本菌株の示す拮抗作用は，菌体にあるのではなく，菌体から培養液中に放出される抗菌成分に起因することが明らかとなった．

ｂ　抗菌成分の生産のための最適培養条件

RC-2株の培養上清に含まれる抗菌成分が最も良く生産される最適培養条件について検討した．PS, PD, KB, LB, 0.5％PPD，ジャガイモ半合成の各液体培地を100 ml容三角コルベンにそれぞれ10ml入れ，本菌株を２日間25℃暗黒条件下で振とう培養（130 rpm）した．その後各上清を遠心分離（8000×g，10分）で回収し，ミリポアフィルター（0.45μm）でろ過後それぞれ20μlをPSA平板上の一方に置いた直径８mmの円形ろ紙に滴下し，もう一方に検定菌*C. dematium* S8901株を移植して両者をそれぞれ30mm離して対峙させた．数日間25℃で培養後，ろ紙と生育した検定菌の菌糸先端部との直線距離により検定菌の生育阻害程度を評価した．その結果，PS，PD，0.5％PPD液及びジャガイモ半合成液で阻害活性が見られ，特に後２者において顕著な阻害活性が見られた．なお，活性を示した培養上清は，10分間のボイル処理後でも，ほぼ同程度の活性を示した．

最も強い活性を示した0.5％PPD液を標準培地として，ペプトン含量，培養温度の違いによる活性程度の差異について検討した．ペプトンの含量が０, 0.01, 0.1, 0.5％のPPD液を作成し，上述と同様に25, 27, 30, 35℃の暗黒下で２日間培養して得られた各無菌上清をPSAの平板上の*C. dematium*の菌叢小片に10μl滴下した．滴下４および７日後に，生長した菌叢直径を測定した．０および0.01％PPD液では，菌叢生育を阻害する抗菌活性が弱かったのに対し，0.5％PPD液では，顕著な抗菌活性を示した（Fig. 36）．また，培養温度の違いによる抗菌活性の明瞭な差異は見られなかった．培養温度25℃において，ペプトン含量が１～５％のPPD液から得られた培養上清の抗菌活性についても同様に検討したが，これらの活性程度は0.5％PPD液のものとほぼ同程度であった．１～15％のペプトン水で培養して得られた培養上清においても，弱いながらも抗菌活性が認められた．

培養日数および振とう条件について検討した．上述と同様に，0.5％PPD液で本菌株を25℃暗黒下で１，２，４および7日間培養した．振とう条件は０, 90, 130rpmの３段階を設定した．各培養液から調製した無菌上清を同様に*C. dematium*の菌叢小片に滴下し，活性を調べた．振とうしない静置条件では培養１および２日後の上清で活性は見られず，培養３日目以降の上清で活性

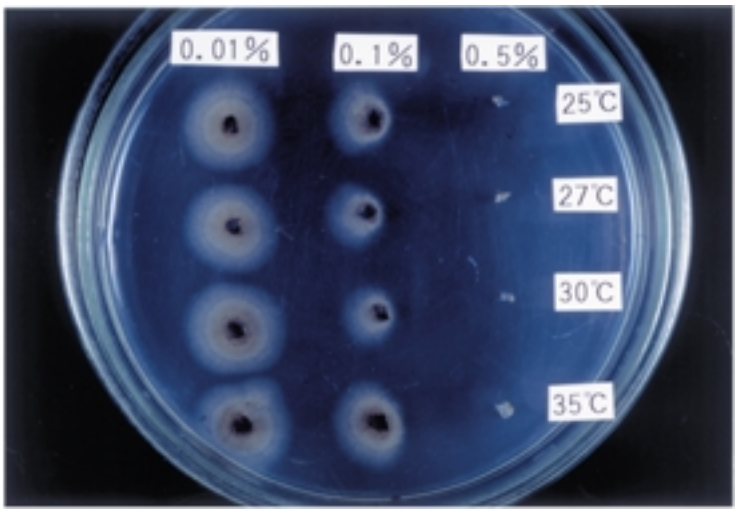

Fig. 36. Effect of culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* RC-2 incubated with PPD broth containing various concentration of pepton and incubated at various temperatures on mycelial growth of *C.dematium* on PSA plate. Observations were performed 3 days after placing each filtrate on mycelial blocks.

を示した．振とう程度が90および130 rpmの場合は，培養１日後の上清ですでに活性が見られ，培養７日後の上清でもほぼ同程度の活性を示した．

c　抗菌成分の活性スペクトル

RC-2株の培養上清の９種の植物病原細菌および10種の植物病原菌に対する抗菌活性を調べた．病原細菌に対しては，*Agrobacterium tumefaciens*および*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*等に対して大型の阻止円を形成して強い活性が見られたが，*Pseudononas*属細菌に対しては，活性は弱かった（Table 20）．一方，糸状菌に対しては，いずれの菌糸生育も強く阻害し，特にクワ炭疽病菌*C. dematium*，クワ白紋羽病菌*Rosellinia necatrix*，イネいもち病菌*Pyricularia oryzae*に対して顕著な阻害活性を示した．

d　抗菌成分のクワ葉上での発病抑制効果

①切り取り葉試験：　クワ葉上における，RC-2株の培養上清希釈液の発病抑制効果を調べた．原液～1/32希釈の培養上清を塗付または滴下した葉では，本菌による病斑が形成されなかった．また，同時に本菌の発芽に対する影響についても検討した結果，培養上清の原液～1/16希釈液添加により，顕著な発芽阻害が観察された．

培養上清の処理時期別による発病抑制効果を調べた．本菌接種１日後に培養上清を塗付した葉では発病したが，本菌接種以前に塗付した葉では，顕著な発病抑制効果が見られた（Table 21）．

②ポット試験：　ポット植えのクワ葉におけるRC-2株の培養上清の*C. dematium*に対する発病抑制活性について検討した．接種以前に培養上清を塗付した葉において発病はいずれも抑制された（Table 21）．

３．拮抗細菌の生産する抗菌成分の単離・精製および同定

(1) 材料および方法

a　抽出材料の作成および抽出

単離・精製に用いるための培養上清を以下のように調製した．300ml容三角コルベンに50mlの0.5％PPD液を入れ，RC-2株を移植後25～27℃の室内条件下で２日間振とう培養（130 rpm）した．培養後遠心分離（8000×g，20分）により上清を回収し，凍結乾燥した．この手順を繰り返すことにより，約11ℓ分の培養上清から凍結乾燥物にして約60gの抽出材料を得，これを活性成分の単離・精製に用いた．

b　活性成分の検出

各精製段階における活性成分の検出は，前述と同様にPSAの平板上に*C. dematium* S8901株の菌叢小片を置床し，それらに50％メタノールを用いて所定濃度に希釈した各試験液20μlを滴下し，３日間培養後に生長した菌叢直径を測定して，各試験液の生育阻害能を調べることにより行った．

c　分析機器

高速液体クロマトグラフィーは，Waters社製の626ポンプおよび600Sシステムコントローラーを用い，検出器は，同社製の996 Photodiodo array detecterを用いた．カラムは，分析用としてShodex C18-5B（4.6×250mm），分取用としてShim-pack PREP-ODS（20×250mm）を用い，カラム温度は40℃，流量は分析の場合は１ml/分，分取の場合は８ml/分とした．NMR測定は，日本電子製JNM A600 FT-NMR Systemで，高速原子衝撃質量分析（FAB-MS）は，日本電子製JNS SX 120Aを用いて行った．

(2) 結　果

a　抗菌成分の単離・精製

RC-2株の培養上精乾燥粉末約60gから，Fig. 37に示した手順により抗菌成分の単離・精製を行った．乾燥粉末を酢酸エチル，メタノール，水の順で抽出し，活性を示したメタノール抽出液を水に転溶後，化学修飾型シリカゲル（Varian Analytichem，Bondesil C18）を充填したカラム（22×200 mm）に吸着させ，40％，55％，75％，100％メタノール／水により順次溶出した．活性を示した75％メタノール画分を，上記のカラムでさらに60％，70％，100％メタノール／水画分に分画した．次に，活性を示した70％メタノール画分を濃縮・乾固し，これを100％，80％，60％，40％，20％メタノール／水および100％水の順で抽出し，最も強い活性が

Table 21. Inhibition of anthracnose disease on mulberry leaves treated with culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* RC-2 before or after inoculation with *C. dematium* [a)]

Filtrate treatment [b)]	Lesion formation							
	Detached leaves [c)]				Attached leaves [d)]			
11 days before inoculation					–	–	–	–
3 days before inoculation	– [e)]	–	–	–	–	–	–	–
2 days before inoculation	–	–	–	–	–	–	–	–
1 day before inoculation	–	–	–	–	–	–	–	–
Same day with inoculation [f)]	–	–	–	–	–	–	–	–
1 day after inoculation	+++	+	++	++				
Control [g)]	+++	+++	+++	++	+	+	++	++

a) Culture filtrate of strain RC-2 was obtained from 0.5% PPD broth shaked for 2 days at 25 °C.
b) Culture filtrate was treated on mulberry leaves, and *C. dematium* was inoculated by spraying a conidial suspension.
c) Four cut leaves (cv. Shin-ichinose) were used at each day for treatment of the filtrate. Observation was performed 8 days after inoculation of the fungus.
d) Four pots of mulberry tree (cv. Shin-ichinose) were used, and a leaf of each tree was used at each day for treatment of the filtrate. Observation was performed 6 days after inoculation of the fungus.
e) Diameter of anthracnose lesion: –, no lesion; +, 5-8 mm; ++, 9-12 mm; +++, over 13 mm.
f) Culture filtrate was treated to the leaves 2 hr before inoculation.
g) Conidial suspension was inoculated to the nontreated leaves.

検出された80％メタノール画分について，分取HPLCによる精製を行った．

その結果，合計７種の活性成分を単一ピークとして単離した．これら７種の活性成分（compound 1～7）のUV吸収ピークはいずれもλMeOH 275.7nm付近に観測され，得られたcompound 1～7の量はそれぞれ，30mg，15.7mg，20mg，9mg，3.5mg，3.7mg，2.5mgであった．

b　抗菌成分の同定

単離された７種類の活性成分のうち，compound 1は^{1}H-NMRスペクトルではパラ位が置換されたベンゼン環由来のプロトン（7.01, 6.65ppm, doublet, それぞれ2H），6.6～8.8ppmにアミノ基由来のプロトン，3.6～4.6ppmにアミノ酸のαプロトン，1.6～3.0ppmにアミノ酸の側鎖由来のプロトン，1.0～1.5ppmにβアミノ酸のメチレン鎖由来のプロトン，0.84ppmにβアミノ酸の末端のメチルプロトン（triplet, 3H, J_{H-H}＝6.9 Hz）が検出された．また，^{13}C-NMRおよびDEPTスペクトルからは，170～175ppmに12個のカルボニル炭素，155.8ppmにOH基により置換されたベンゼン環C4位の４級炭素，129.7，115.0ppmにベンゼン環のメタ位およびオルト位由来のメチン炭素（それぞれ2C），127.9ppmにベンゼン環由来の４級炭素，45～62ppmにアミノ酸のα炭素由来のメチン炭素，13～62ppmにアミノ酸の側鎖由来の炭素，13.9ppmにβアミノ酸の末端由来のメチル炭素が検出された．さらにC-H COSY，H-H COSY，HMBCの各種2D NMRスペクトルにより各HおよびC炭素を帰属したところ，この化合物は８個のアミノ酸が下記の配列で環状に結合したペプチドであることが明らかになった．

直鎖アルキル基を側鎖に持つβアミノ酸→Asn→Tyr→Asn→Gln→Pro→Asn→Ser→

また，この化合物はFAB-MSスペクトルにより$[M+H]^{+}$＝1043を与えたことから，分子量は1042であることが明らかになった．

この化合物は，本細菌と類似種である*B. subtilis*でその生産がすでに報告されている一連の抗生物質群iturin誘導体と類似するものと考え，iturin A2，A6，A7の標品およびcompound 1についてHPLCによるRetention TimeおよびUV-VISスペクトルを比較したところ，compound 1はiturin A2と完全に一致した．compound 1の^{1}H-NMRスペクトルでは，アルキル鎖末端のメチルプロトンがtripletかつ３個分のHに相当すること，またiturin A2の分子量は1042でcompound 1と一致することから，compound 1はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_{10}CH_3$を持ったiturin

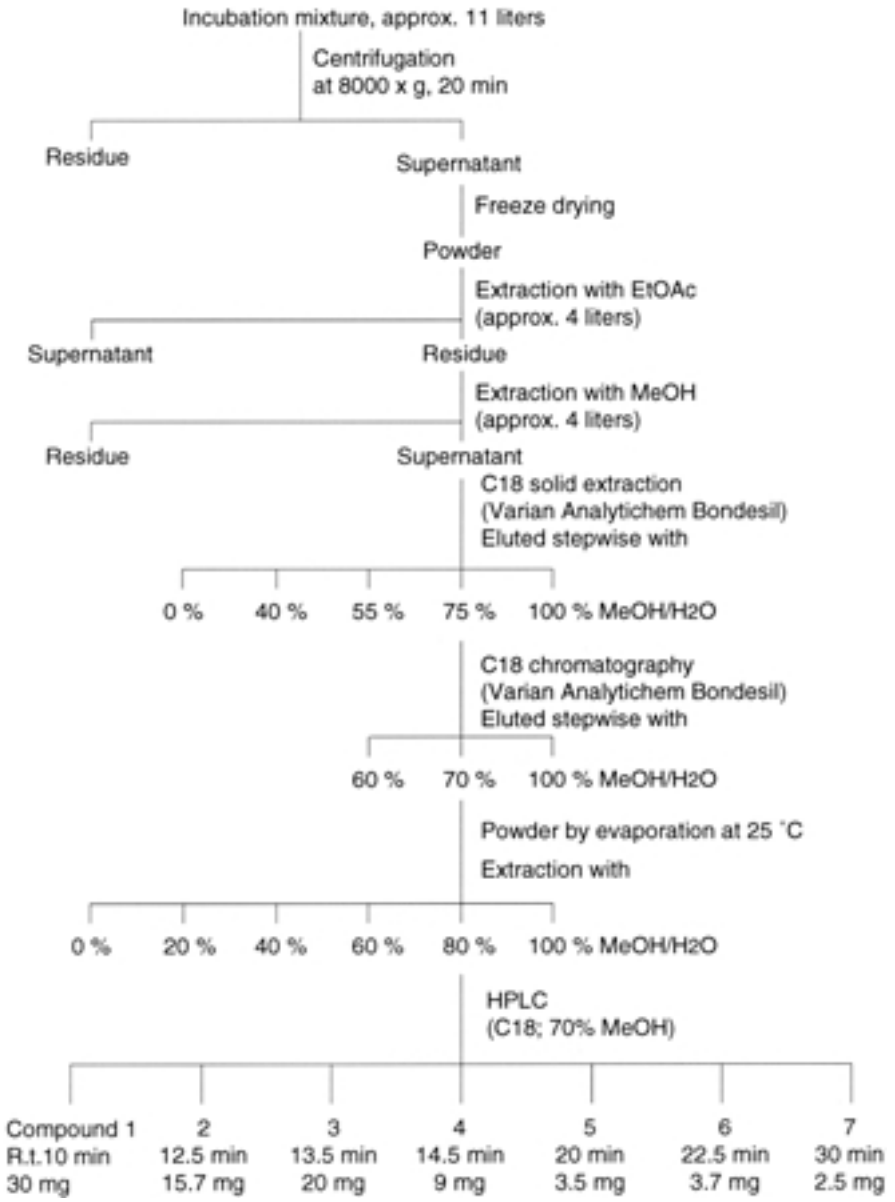

Fig. 37. Isolation procedures for antimicrobial compounds from culture filtrate of *B. amyloliquefaciens* RC-2.

A2であると決定した．compound 1の^{1}H-NMRおよび^{13}C-NMRスペクトルをそれぞれFig. 38，39に示した．

compound 2～7も，上記と同様に各種NMRスペクトルにより解析したところ，いずれもiturin 誘導体であることが明らかとなった．compound 2は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.85ppm（triplet, 3H, J_{H-H}＝7.3 Hz）および0.84 ppm（doublet, 3H, J_{H-H}＝7.3Hz）に検出された．また，^{13}C-NMRスペクトルにより，19.1および11.2ppmにβアミノ酸の側鎖由来のメチル炭素が検出された．また，この化合物の分子量はFAB-MSスペクトルにより1056であった．また，各種NMRスペクトルの分析結果と併せて，compound 2はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_8CH(CH_3)CH_2CH_3$を持ったiturin A3であると決定した．

compound 3は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.87ppm（doublet, 6H, J_{H-H}＝6.6 Hz）に検出された．また，^{13}C-NMRスペクトルにより，22.5ppmにβアミノ酸の側鎖由来の

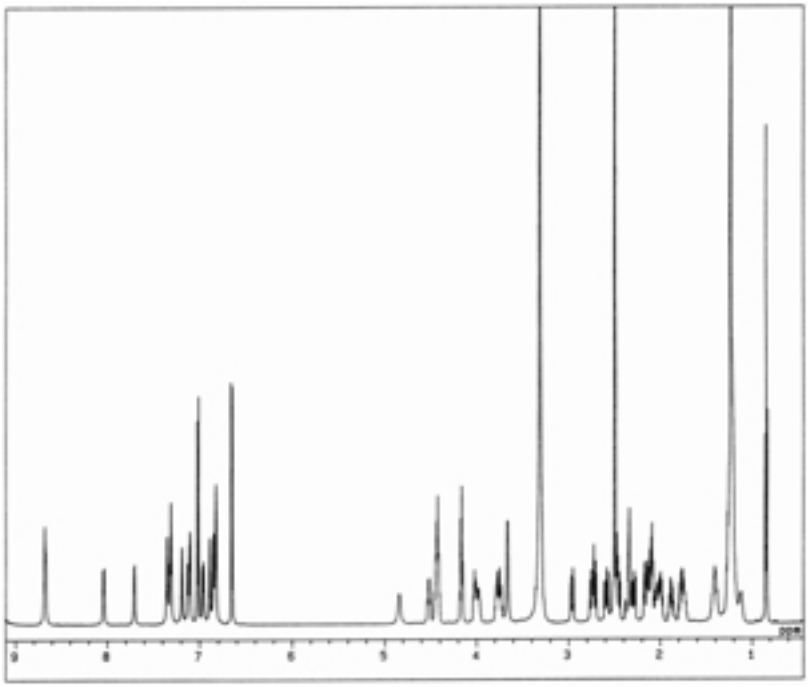

Fig. 38. ^{1}H-NMR spectrum of compound 1 at 600 MHz（10 mg/0.6 ml DMSO d_6）.

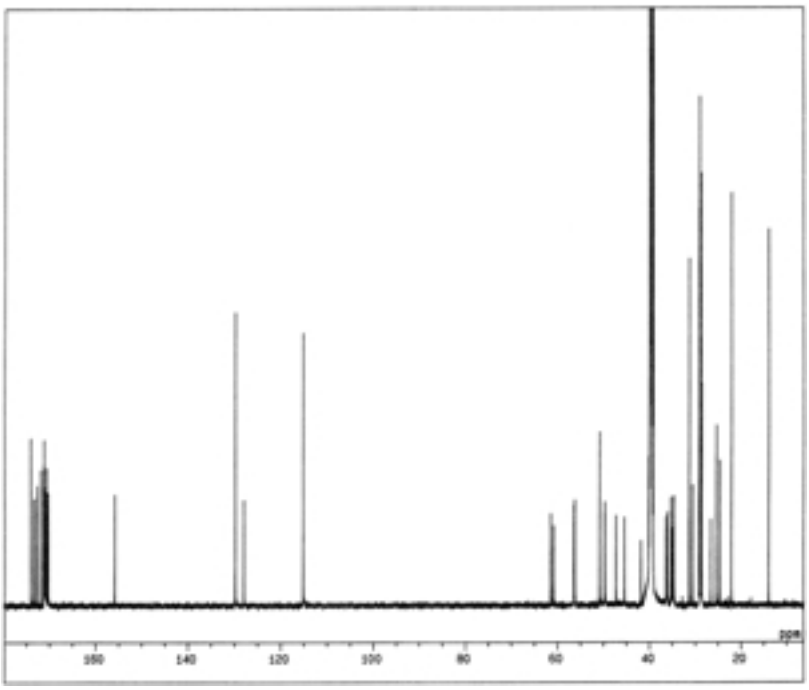

Fig. 39. ^{13}C-NMR spectrum of compound 1 at 600 MHz（10 mg/0.6 ml DMSO d_6）.

メチル炭素２個分が検出され，分子量は1056であった．さらに，各種NMRスペクトルの分析結果と併せて，compound 3はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_9CH(CH_3)_2$を持ったiturin A4であると決定した．

compound 4は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.88ppm（triplet, 3H, J_{H-H}＝7.0 Hz）に，^{13}C-NMRスペクトルによりメチル炭素が13.9ppmに１個分検出され，分子量は1056であった．さらに，各種NMRスペクトルの分析結果と併せて，compound 4はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_{11}CH_3$を持ったiturin A5であると決定した．

compound 5は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.87ppm（doublet, 6H, J_{H-H}＝6.6 Hz）に，^{13}C-NMRスペクトルによりメチル炭素が22.5ppmに２個分検出され，分子量は1070であった．さらに，compound 5とiturin A6の標品はHPLC分析におけるRetention TimeおよびUV-VISスペクトルが完全に一致したことから，各種NMRスペクトルの分析結果と併せて，compound 5はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_{10}CH(CH_3)_2$を持ったiturin A6であると決定した．

compound 6は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.88ppm（triplet, 3H, J_{H-H}＝7.0 Hz）に，^{13}C-NMRスペクトルによりメチル炭素が13.9ppmに１個分検出され，分子量は1070であった．さらに，compound 6とiturin A7の標品はHPLC分析におけるRetention TimeおよびUV-VISスペクトルが完全に一致したことから，各種NMRスペクトルの分析結果と併せて，compound 6はβアミノ酸の側鎖に$(CH_2)_{12}CH_3$を持ったiturin A7であると決定した．

compound 7は，^{1}H-NMRスペクトルにより，βアミノ酸のアルキル側鎖中のメチルプロトンが0.88ppm（triplet, 3H, J_{H-H}= 7.0 Hz），0.85ppm（triplet, 3H, J_{H-H}＝7.3 Hz）および0.84ppm（doublet, 3H, J_{H-H}＝7.3 Hz）に検出された．また，^{13}C-NMRスペクトルによりメチル炭素が19.0, 13.9，11.1ppmにそれぞれ1個分ずつ検出され，分子量は1084であった．この化合物はiturin骨格を持ち，βアミノ酸のアルキル側鎖は組成が$C_{14}H_{29}$の飽和アルキルで，かつ末端に$(CH_2)_nCH_3$および$(CH_2)_mCH(CH_3)CH_2CH_3$の両方を持つ化合物であると考えられるが，それぞれがどの位置に結合しているのかを特定するまでには至らなかった．今後，マススペクトルによる解析等を利用して，完全に構造を決定する必要がある．

なお，Table 22にcompound 1～7それぞれの８種のアミノ酸についての^{13}C-NMRスペクトルの帰属を示すとともに，構造の決定したcompound 1～6，すなわちiturin A2～A7の化学構造をFig. 40に示した．

４．考　察

健全クワ葉から分離されたクワ炭疽病菌*C. dematium*に対する拮抗細菌RC-2株は，*B. amyloliquefaciens*と同定した．本細菌は，*B. subtilis*と類似した種であり，Welker and Campbel（1967）によると，*B. amyloliquefaciens*は*B. subtilis*よりもDNA中のG＋C％がわずかに高いことで区別される（Sneath，1986）．本細菌種を植物病原糸状菌に対する生物防除に用いる報告は，その類縁種である*B. subtilis*（Citernesi *et al.*，1994；Podile and Prakash，1996；Utkhede and Smith，1992）に比べ多くはないが，Mari *et al.*（1996）は，ナシの灰色かび病菌である*Botrytis cinerea*に対する拮抗細菌として，本種細菌を殺菌剤とともに貯蔵果実に施用することにより，発病を抑制できることを報告している．さらに，この発病抑制活性は，抗菌成分の生産ではなく，病原菌と拮抗細菌との栄養競合に起因するものと推察している．

しかしながら，今回分離したRC-2株の*C. dematium*に対する抑制活性は，培養した細菌の菌体そのものでなく，培養上清に認められたことから，本細菌が上清中に生産した抗菌成分に起因することが明らかとなった．またその生産条件としては，0.5％PPDおよびジャガイモ半合成液体培地中でその生産が良好であったことから，ある一定量のペプトン（アミノ酸）が本活性成分の生産に必須であることが考えられた．実際，ペプトン含量を変えたPPD液から調製した培養上清の抗菌活性を調べた結果，０～0.5％濃度の範囲でペプトン含量が増えるに伴い，活性も高まる傾向が見られた．また，各濃度のペプトン水で培養して得られた培養上清でも抗菌活性が見られた．これらの結果は，本細菌の抗菌成分の生産には，ペプトン（アミノ酸）が必須の基質であることを示唆するものである．各種微生物がその二次代謝産物として各種生理活性ペプチドを生産す

Table 22. ^{13}C-NMR spectra of antimicrobial compounds 1-7 in DMSO d_6

Compounds							Assignment [a]
1	2	3	4	5	6	7	
174.1	174.1	174.1	174.1	174.0	174.0	174.0	L-Gln^4(Cδ)
171.8	171.8	171.9	171.8	171.8	171.8	171.8	D-Asn^6(Cγ)
171.0	171.0	171.0	171.0	171.0	171.0	171.0	D-Asn^3(Cγ)
170.6	170.6	170.6	170.6	170.6	170.6	170.6	L-Asn^1(Cγ)
61.4	61.4	61.4	61.4	61.3	61.4	61.3	L-Ser^7(Cβ)
60.8	60.8	60.8	60.8	60.7	60.7	60.7	L-Pro^5(Cα)
56.3	56.3	56.3	56.3	56.3	56.3	56.3	D-Tyr^2(Cα)
56.2	56.2	56.2	56.2	56.2	56.2	56.2	L-Ser^7(Cα)
50.8	50.8	50.8	50.8	50.7	50.8	50.8	D-Asn^6(Cα)
50.8	50.8	50.8	50.8	50.7	50.8	50.7	L-Asn^1(Cα)
49.7	49.7	49.7	49.7	49.7	49.7	49.7	D-Asn^3(Cα)
49.6	49.6	49.6	49.6	49.6	49.6	49.6	L-Gln^4(Cα)
47.2	47.2	47.2	47.2	47.2	47.2	47.2	L-Pro^5(Cδ)
45.4	45.4	45.4	45.4	45.4	45.4	45.4	β-Amino Acid(Cα)
36.3	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3	36.3	L-Asn^1(Cβ)
36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	D-Asn^3(Cβ)
35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.2	35.3	D-Asn^6(Cβ)
34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	D-Tyr^2(Cβ)
34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	34.6	β-Amino Acid(Cβ)
30.6	30.6	30.6	30.6	30.5	30.6	30.6	L-Gln^4(Cγ)
29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	L-Pro^5(Cβ)
26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	L-Gln^4(Cβ)
25.4	25.4	25.4	25.4	25.3	25.4	25.3	β-Amino Acid(Cγ)
24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	L-Pro^5(Cγ)

a) Superscript number of each amino acid corresponds to each number of composed amino acid of iturin derivatives designated in Fig. 40.

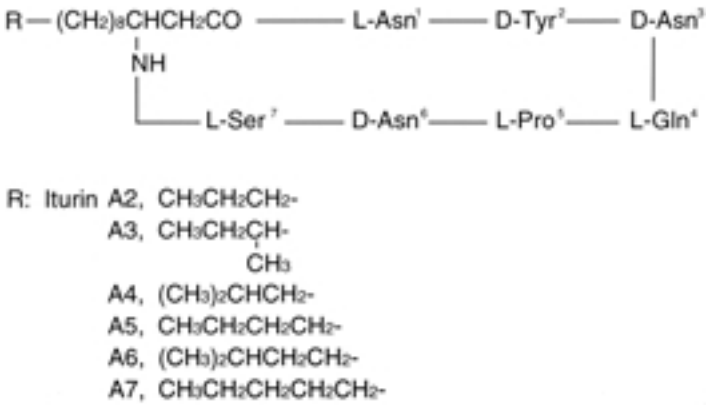

Fig. 40. Chemical structure of iturin A2- A7 produced by *B. amyloliquefaciens* RC-2.

ることが，詳細に調べられており（梅沢ら，1976），本細菌の属する*Bacillus*属細菌においても多種の抗菌ペプチド物質を生産することが知られている（Slepecky and Hemphill，1992）．本細菌においても，生産される抗菌成分はペプチド物質であり，そのために，その基質としてペプトンが必要となる可能性が考えられる．なお，今回供試した培地において，KB液体培地にもペプトンが２％の割合で含まれているが，この培地からの培養上清には顕著な活性は認められなかった．この理由については不明であるが，この培地中では活性成分の生

産を阻害する成分が存在または生産されている可能性が考えられる．

本細菌の培養上清の活性スペクトルについて検討した結果，植物病原細菌に対しては，数種の細菌に対し強い活性を示したが，*Pseudomonas*属細菌に対しては強い活性を示さなかった．一方，植物病原糸状菌に対しては，クワ炭疽病菌を含めた各種糸状菌で顕著な生育抑制活性を示した．このことから，本抗菌成分は植物病原糸状菌に対して，より幅広い抗菌活性スペクトルを有することが示唆された．

本抗菌成分の*C. dematium*に対する発病抑制効果を実際の植物葉上で調べた結果，切り取り葉およびポット成葉いずれにおいても，顕著な発病抑制活性を示した．また，この発病抑制効果は，病原菌接種以前の処理により見られ，病原菌接種以降の処理では効果は見られなかったことから，本抗菌成分は，宿主へ侵入する以前の病原菌に対し活性を示すことが考えられた．実際，培養上清の本菌分生子の発芽への影響について調べた結果，培養上清の添加により分生子の発芽が顕著に阻害された．これらのことから，本成分は，本病の治癒効果ではなく，分生子の発芽を阻害することに基づく予防効果を持つことが示唆された．また，その他の各種拮抗細菌を用いた病害防除においては，殺菌剤との併用により更に効果的な防除効果を示すことが知られており（Mari *et al.*，1996；染谷ら，1998），本抗菌成分の施用においても，治癒効果を期待した殺菌剤の併用により防除効果が高まることが考えられる．

*Bacillus*属細菌は多種の抗菌物質を生産し，特に*B. subtilis*は，subtilin（Gross *et al.*，1973），bacilysin（Walker and Abraham，1970），mycobacillin（Sengupta *et al.*，1971）等計68種類の抗菌物質を生産することが知られている（Slepecky and Hemphill，1992）．これらの*B. subtilis*の生産する抗菌物質の一つに，環状ペプチド物質であるiturin Aが抗糸状菌物質として報告（Delcambe，1965）されており，その構造についても解明されている（Isogai *et al.*，1982；Garbay-Jaureguiberrt *et al.*，1978；Peypoux *et al.*，1973；1978）．また，Isogai *et al.*（1982）は，iturin AをHPLCにより８つの成分に分け，それぞれの違いは，環状ペプチドの中のβアミノ酸に結合しているアルキル側鎖の違いによることを明らかにした．今回RC-2株から単離した７種中６種の抗菌成分は，iturin A2～A7とそのNMRスペクトル，質量スペクトルがそれぞれ一致した．これにより，*B. amyloliquefaciens* RC-2株の生産するクワ炭疽病菌*C. dematium*に対する抗菌成分は，iturin A2，A3，A4，A5，A6，A7，および同じくiturin骨格を持つ構造未決定のcompound 7であることが明らかとなった．畑田ら（1990）は，iturin Aの植物病原菌に対する生理作用として，イネいもち病菌*P. oryzae*の胞子発芽阻害作用を示すことを明らかにしており，それ以外の生理作用として，血小板凝集阻害およびヒスタミン遊離抑制作用を示すことを見い出した．iturin Aの*C. dematium*に対する生理作用については，菌糸生育抑制作用や分生子の発芽阻害作用を示すことが考えられるが，クワ葉に対する生理作用についても今後検討する必要がある．さらに，本物質を含む培養上清は本病菌だけでなく，正田（1991）が報告したのと同様に，各種の植物病原糸状菌に対して幅広い抗菌活性を有していたことから，これらの病原菌に対する防除剤として利用できる可能性が考えられる．

X　総合考察

クワ炭疽病の病原菌の種名について再検討を行うために，全国の罹病クワ葉から本病菌の分離を行った結果，炭疽病菌として*C. dematium*，*C. acutatum*および*G. cingulata*が分離された．これら３種のうち*C. dematium*は，原（1925）および山本（1960）により本病菌としてそれぞれ記載された*C. morifolium*および*C. dematium* f. *morifolium*と同じであると判定されたことから，これら記載種を*C. dematium*の異名とすることを提案した．また，その分離頻度およびクワ葉に対する病原力試験から，*C. dematium*は本病の主たる病原菌であることを明らかにした．一方，*C. acutatum*および*G. cingulata*は，クワ葉に病原性を示すものの，その程度は*C. dematium*と比較して弱く，その分布も少ないことから，これら両種は，クワに対してはさほど重要でない病原菌であるとも考えられる．また，*G. cingulata*については，本菌単独で引き起こされる自然発病の形態が明確ではない．安藤（1993）は，*Pestalotiopsis longiseta*によるチャの輪斑病の茎壊死部では，*P. longiseta*が健全茎に感染を

引き起こし，その病斑形成に伴ってチャ赤葉枯病菌として知られる*G. cingulata*に交代しながら病斑を拡大していく現象を見い出した．すなわち，*G. cingulata*は病斑上で二次的に寄生する病原菌であることを示唆している．クワ葉においても，*C. dematium*等により形成された病斑上で，*G. cingulata*が二次感染し，菌が増殖し，病斑拡大を引き起こしている可能性も考えられる．しかし，クワから分離された*G. cingulata*および*C. acutatum*は，切り取り葉に弱いながらも病原力を有すること，さらにその宿主範囲が広かったことから，これら両菌にとって好適な環境が整えば，クワに被害を及ぼし，さらにはその周囲の宿主植物にも被害を及ぼすことが考えられる．

クワに強い病原力を示す*C. dematium*の各種植物葉に対する病原性は，*G. cingulata*および*C. acutatum*に比べその範囲は小さかったものの，リンゴやユリノキ等数種で認められた．この結果は，本菌はクワ以外にも感染し得ることを示唆しており，クワ特異的病原菌とする分化型を当てはめるべきでないと判断した．しかし，各種宿主由来の*C. dematium*およびその分化型のクワ葉に対する病原性の比較試験において，分生子の無傷接種ではクワ菌のみがクワ葉に強い病原力を示したことから，各宿主の*C. dematium*は，ある程度それぞれの宿主植物に適応すべく分化しているものと推察される．また，有傷および無傷接種で病原性のスペクトルが異なっていたことから，恐らく無傷下で宿主に侵入する段階の抵抗性とそれに打ち勝つ病原性の相互作用機構が宿主適応あるいは分化に大きく係わっていると推察される．この侵入時の分化が何に基づいて起こるのかは，今後の検討課題であるが，エンドウと褐紋病菌（*Mycosphaerella*属）の系で知られているサプレッサー（甲元，1990）の関与も考えられる．すなわち，各宿主由来の*C. dematium*が各宿主に侵入する段階において，サプレッサー等の特異的な抵抗性撹乱物質を生産し，それを宿主側が受容して抵抗反応が抑制され，結果として感染に成功するということも一つの可能性として考えられる．

こうした*C. dematium*の有傷接種と無傷接種による感受性の差異はクワの各品種においても見られ，クワの抵抗性において表皮部の果たす役割は大きいものと考えられる．また，このことより，無傷接種によっても顕著な病斑形成が見られた品種は，本菌に対しての感受性品種とみなすことができ，今回こうした感受性品種を見い出した．一方，全くあるいはほとんど病斑を形成しない抵抗性品種を数品種見い出すことができた．クワの育種において，耐病性という形質は重要な育種目標となっており（片桐，1995），今回の結果は，本病に対する耐病性品種の育成に寄与するデータを提供するものである．なお，本菌の有傷・無傷接種で病斑形成の見られなかった抵抗性品種では，本菌は潜在的に感染していることが追試験によって明らかとなった．今回，本菌は潜在感染すること，さらにそれは，葉の裏面に紫外線を照射することにより顕在化することを確認したが，その潜在化の形態および生理的機構については依然として不明な点が多い．抵抗性品種に対する本菌の接種により菌が潜在する系を用いることで，本菌の潜在感染のメカニズムが解明されることが考えられる．

*C. dematium*の桑樹における発生を定点的に調べた結果，本病は梅雨期である６月下旬～７月上旬に初発が見られ，その発生部位は地際部の葉であった．このことは，本病の当年の第一次伝染源は土壌で越冬した本病菌であることを示唆するものである．そこで実際，*C. dematium*の野外土壌での生存性について検討した結果，本菌は罹病葉中で越冬する可能性の高いことが明らかとなった．また，枝条での越冬性についても検討を行ったが，枝の表面において本菌は早期に死滅し，剥いだ皮部においても長期間の生存は見られなかったことからも，罹病葉が本菌の主たる越冬源である可能性が高い．こうした罹病葉中での本菌の形態としては，菌糸のほかに分生子層に付随した分生子が考えられる．これらの罹病葉上の分生子は，粘湿物で包まれており，本菌分生子と類似の形態を示す*C. graminicola*の場合は，それはspore matrix と呼ばれ（Nicolson，1992），乾燥・紫外線等から分生子を保護する役割を持つとされる．本菌分生子の周囲で観察される粘湿物もspore matrixと同様の役割を持つことが考えられ，洗浄分生子と比較して生存期間は伸びる可能性が考えられる．仮に，これらの既存の分生子が翌春まで生存し得なかったとしても，罹病葉の菌糸から新たに形成された分生子層上

の分生子が第一次の伝染源となることが考えられる．一旦発生した本病は，育苗床で見られたように他の炭疽病菌と同様雨滴等によりきわめて容易に周辺に二次伝搬されるものと推察された．以上の結果より，*C. dematium* による野外での本病の発生生態と伝染環は次のように説明することができる．すなわち，秋季に落葉した罹病葉で本菌は越冬し，翌春その葉上に形成された分生子が雨滴あるいはトラクター等の管理機の走行等により，土壌とともに地面に近い健全葉に跳ね上がり，地際部の葉で本病の初発をもたらす．その後は，地際部の罹病葉上で形成された分生子の飛散により，発病が桑樹内の葉において垂直的に拡大し，落葉期にわたって蔓延するようになる．こうして生じた罹病葉が落葉・越冬し，翌年の伝染源となる．なお，本菌の第一次伝染源には罹病葉以外に見かけ上健全な潜在感染葉もなり得ることが考えられる．このことより，本病の効果的な防除法の一つとして，罹病葉を含めた落ち葉を圃場から除去する方法が有効であろうと判断される．また，*C. dematium* の感染と肥培条件との関係においては，感受性品種では明瞭な関係が見られなかったが，中程度の抵抗性を示す普及奨励品種では施肥が過剰あるいは不足の状態で感染しやすくなることが明らかとなった．このことから，本病の発生防止には，適正な施肥管理が有効であり大切であると指摘できよう．

C. dematium の伝搬に大きな役割を果たす分生子は，クワ葉上において高率に発芽し付着器を形成し，その付着器から穿孔糸を生じ葉内に侵入した．これらの葉上での高率の発芽は，クワ葉から得られた葉面溶出液によって誘導されていた．しかし，クワ葉以外の葉から得られた葉面溶出液でも発芽は誘導されたことから，これら溶出液中の発芽誘導因子はクワ葉特有の成分ではないと考えられる．しかし葉上における付着器形成の形態については，宿主植物と非宿主植物とで異なり，非宿主であるヤブツバキ葉上においては，付着器からの穿孔糸挿入は確認できなかった．すなわち，この付着器の形態および行動が本菌の宿主決定の役割を持ち，感染に大きな影響を及ぼすことが推察される．付着器の果たす役割についてはEmmett and Parbery（1975）により詳細に述べられており，付着器は，葉面への付着，宿主体内への侵入，生存，および酵素や毒素の生産部位としての役割を有している．本菌が付着器からクワ葉内に穿孔糸を挿入する際に，こうした酵素類を生産して表皮層を崩壊させて侵入するのか，または物理的圧力により侵入するのかは，現在のところ不明であり，組織学的観察も含めて検討する必要がある．また，宿主抵抗性を抑制するサプレッサー等の物質が穿孔糸の挿入時に生産されることも考えられ，本病の感染機構は本菌の潜在性との関連を含め興味の持たれる研究領域である．

C. dematium により感染したクワ葉は，その後褐色の病斑を生じるが，これらの病斑部では健全葉に壊死斑を形成させる毒素が４種生産されることが明らかとなった．これらの毒素については，単離物質が微量であったため同定はできなかったが，いずれも蛍光性の低分子化合物であることが明らかとなった．本毒素は，PSA等の人工培地中では生産されず，クワの生葉およびオートクレーブ処理葉への接種によってのみ生産された．クワ葉で生産される理由としては，葉中に存在する基質成分を菌が代謝・利用し，その結果として①毒素の前駆物質が作られ，菌はそれを利用して毒素を合成する，②クワ内で毒素生産阻害物質が分解される，③毒素生産誘導因子が作られる，等が考えられる．これら毒素生産誘導機構と毒素の生合成経路については今後の研究課題として残された．

本毒素は宿主特異的毒素ではなく，宿主非特異的毒素（host-nonspecific toxin）であり，また，病斑先端部でも生産されること，さらに葉の褐変化に伴い生産されることから，病斑形成または拡大に関与する病原性因子としての役割を持つ毒素であると判断される．病原性は一般に侵略力と発病力に分けられる（平井ら,1989）．この類別に当てはめると，本毒素は発病力に関与する病原性因子であるということができる．以上の結果より，*C. dematium* のクワ葉上における感染は以下のように起こることが推察される．すなわち，葉上で発芽した本菌分生子は付着器を形成し，そこから穿孔糸を物理的あるいは酵素生産により葉内に挿入して，侵入を成立させる．菌の侵入後は，葉の抵抗反応を回避しながら増殖・定着する．その後は２方向に別れ，一方はそこで安定化して潜在化する．他方では菌の増殖が進

行し，病斑形成または拡大に関与する宿主非特異的毒素を生産するようになり，この毒素により葉の褐変は進行し，最終的には本病の病徴を形成するようになる．

C. dematium による本病の防除法は，現在のところ，他の葉枯性病害との同時防除を兼ねたチオファネートメチル剤が使用されている．今回，本病の新たな防除技術確立のために，拮抗細菌を用いた防除法について検討した．その結果，有望菌株としてRC-2株を健全クワ葉から分離し*B. amyloliquefaciens* と同定した．*B. amyloliquefaciens* を植物病害の生物防除に用いた報告は，本細菌種と類似の種である*B. subtilis* のものと比較するとあまり多くない．Mari *et al.*（1996）は，ナシの灰色かび病菌*B. cinerea* に対し，本細菌種を栄養競合に起因する拮抗細菌として報告している．しかし，今回分離したRC-2株は，抗菌成分を生産しそれを培養液中に放出していた．また，この抗菌成分の生産には基質としてペプトン等のタンパク質あるいはアミノ酸が必須であった．ペプトンを含んだ培地から得られた培養上清をクワ葉に施用した結果，*C. dematium* による発病を抑制する効果が見られ，クワ炭疽病の防除に有効であることが示唆された．この防除効果は，感染以前の施用でのみ見られたことから，予防剤としての利用が考えられる．また，本培養上清は，他の植物病原糸状菌および細菌に対しても生育抑制効果を示したことから，炭疽病以外のクワあるいは他植物の各種病害に対する適用幅の広い防除資材として利用することも考えられる．

RC-2株の培養上清に含まれる抗菌成分を単離・同定した結果，７種の活性成分はいずれもiturin 誘導体であることが明らかとなった．これら一連の物質は，８つのアミノ酸が環状に結合した構造を基本骨格とする環状ペプチドであり，このうちの６種は*B. subtilis* でその生産が知られる抗菌物質（iturin A2～A7）であった（Isogai *et al.*，1982）．これらiturin誘導体の*C. dematium* に対する抗菌作用点を生化学的に明確にすることにより，本病の防除効果をさらに向上させる施用技術あるいは抗菌活性の増強技術の開発につながるものと期待される．

XI　要約

クワ炭疽病は，葉に赤色～褐色の病斑または条斑を引き起こす葉枯性の病害として古くから知られていた．本病は毎年普遍的に発生するにもかかわらず甚大な被害を及ぼすことは稀なため，さほど重要視されていなかった．しかし，近年開発されたクワ栽培技術，すなわち，密植栽培・機械収穫および多回育養蚕用のローリング収穫法等の普及により，本病の発生が目立つようになった．激しい場合には株全体の葉が発病し，ほとんど収穫できなくなる例も見られている．しかしながら，本病の生理・生態および防除法等に関する報告は，若干の記載があるだけで不明な点が多く，効果的な本病の防除法の確立に結びつくような詳細な研究は行われていない．本研究では，クワ炭疽病について，その病原菌を分類・同定し，菌の病原性，感受性のクワ品種間差異，発生生態を調査することによって，本病の主要な病原菌が*Colletotrichum dematium* であることを明らかにするとともに，本菌の毒素生産を含めた感染機構および拮抗微生物を用いた生物的防除法について検討を行った．

１）本病罹病クワ葉から*Colletotrichum* 属病原菌の分離を行った結果，新たに*C. dematium*，*C. acutatum* および*Glomerella cingulata* が分離・同定された．また，これまで本病菌として記載されていた*C. morifolium* はその分生子形態の比較から，*C. dematium* の異名とすることを提案した．さらに，これら３種の炭疽病菌の中で，その分離頻度および病原力から*C. dematium* が本病の主要な病原菌であることを明らかにした．

２）クワ炭疽病菌の宿主範囲を調べるとともに，他宿主由来の炭疽病菌とのクワ葉に対する病原性についての比較検討を行った．その結果，クワ炭疽病菌*C. dematium*，*C. acutatum*，*G. cingulata* はいずれもクワ以外の植物葉に対して病原性を示した．また，クワ葉に対する病原性は，クワ以外の宿主に由来する炭疽病菌でも認められたが，クワ由来の*C. dematium* で最も強い病原力を有することが明らかとなった．

３）本病の主たる病原菌である*C. dematium* を用い，ク

ワ260品種の感受性差異について検討した．菌の接種による病斑形成の有無およびその形成程度により，感受性および抵抗性を示す品種を検索した結果，感受性品種は「長沙」，「彦次郎」等であり，抵抗性品種は「群馬赤木」，「大和早生」等であることが明らかになった．

4）*C. dematium* による本病の圃場における発生消長について検討した．本病は，６月下旬～７月上旬の梅雨期に地際部の葉で初発し，その後秋期になるに連れて桑樹の中間および上部に着生する葉に発病が垂直的に拡大・蔓延した．また，本病の発生は葉の葉位による感受性の差異よりも土壌表面からの距離という物理的条件により強く支配されることが明らかとなった．*C. dematium* の野外での越冬性について調べた結果では，本菌分生子の生存は短期間であったのに対し，罹病葉中での本菌の生存は長期であったことから，本菌の越冬源として，感染葉等の罹病残渣が重要な役割を持つことを明らかにした．

5）*C. dematium* の分生子の発芽および付着器形成に対するクワ葉成分の影響およびクワ葉上での発芽様式について検討した．その結果，分生子の発芽はスライドグラス上では低率であったがクワ葉上では極めて高率であった．また，発芽はクワ葉面の水溶性成分，揮発性成分，クワ葉煎汁液によってそれぞれ誘導された．前２者については，非宿主植物であるイネおよびヤブツバキ葉から得られた成分によっても誘導されたことから，宿主非特異的な葉成分であると考えられた．また，本菌分生子のクワ葉組織への侵入は，接種15～18時間後には成立することが推定された．

6）見かけ上健全に見えるクワ葉の裏面に紫外線を３～５分間照射すると，葉の表面は徐々に褐変し，褐変化に伴って円形の灰褐色斑が多数誘発され，これらの誘発斑には剛毛を伴った分生子層，分生子が形成された．その分生子の形態から，本菌はクワ炭疽病菌*C. dematium* と同定された．このことから，クワ炭疽病菌*C. dematium* は潜在感染し，その潜在感染部は紫外線照射によって病斑として顕在化することが明らかになった．

7）クワ葉中に含まれる*C. dematium* の分生子形成誘導因子について調べた．クワ葉中に含まれる16種のアミノ酸および10種のビタミンについて分生子形成誘導能を調べた結果，ビタミンの一種であるbiotinにのみ誘導活性が認められた．活性を誘導するbiotinの最低濃度は0.01ppmであり，また，biotinは乾燥クワ葉中１kg当り，約0.6mg含まれていることから，biotinが本菌の分生子形成因子の１つであることが明らかとなった．

8）*C. dematium* による本病の病徴から，葉の罹病部では毒素が生産されている可能性が考えられた．そこで，病斑部からのアセトン粗抽出液を健全クワ葉に有傷滴下したところ，壊死斑が形成された．この粗抽出液は，クワ以外の様々な植物葉にも壊死斑を形成したが，本菌のホストレンジとは一致しなかったことから宿主特異的な毒素ではないと判断された．しかし，そのクワ葉に対する活性は，品種によって異なり，その差異は，本菌の分生子接種による感受性の差異と一致したことから，本毒素は本菌の病原性因子の一つであると考えられた．この粗抽出液から，活性成分の単離・精製を試みた結果，４種の低分子の蛍光化合物が得られた．なお，本毒素は人工培地上では生産されないことから，毒素の生合成には，クワ葉の成分が必要であることが明らかになった．

9）*C. dematium* の生育および発病を抑制する細菌RC-2株を健全クワ葉から分離した．本細菌は*Bacillus amyloliquefaciens* と同定され，本細菌の示す発病抑制活性は，菌体そのものにあるのでなく培養上清に含まれる成分によること，また，*C. dematium* の感染前に処理することにより認められた．この抗菌成分は，イネいもち病菌等の他の病原糸状菌に対しても生育阻害活性を示したことから，各種病原糸状菌に対する生物防除剤として有用であることが示唆された．この抗菌成分を培養上清から単離・精製し，その構造を解析した結果，環状ペプチドのiturin誘導体であった．

Ⅻ 引用文献

安藤康雄（1993）*Pestalotiopsis longiseta*によるチャ輪斑病の生理・生態的研究．野菜茶試研報，B6：21～64．

Arx, J. A. von（1957）Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopath. Z., 29 : 413～468.

Arx, J. A. von（1981）The genera of fungi sporulating in pure culture 3rd. edit., pp. 220～223, J. Cramer, Berlin.

Arx, J. A. von（1987）Plant Pathogenic Fungi, pp. 218～220, J. Cramer, Berlin.

Bailey, J. A. and Jeger, M.J.（1992）"*Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control", C.A.B. International, Wallingford, 388 pp.

Bailey, J. A., O'Connell, R. J., Pring, R. J. and Nash, C.（1992）Infection strategies of *Colletotrichum* species. In "*Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control"（Ed. Bailey, J. A. and Jeger, M. J.）, pp. 88～120, C.A.B. International, Wallingford.

Ballio, A., Bottalico, A., Buonocore, V., Carilli, A., Di Vittorio, V. and Graiti, A.（1969）Production and isolation of aspergillomarasmin B（lycomarasmic acid）from cultures of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.（*Gloeosporium olivarum* Alm.）. Phytopath. Meditterranea, 8: 187～196.

Baxter, A.P., van der Westhuizen, G.C.A. and Eicker, A.（1983）Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African J. Botany, 2: 259～289.

Blakeman, J. P.（1968）Studies on the influence of leaf washings on infection by *Mycosphaerella ligulicola*. Ann. Appl. Biol., 61: 77～88.

Boudreau, M. A. and Madden, L. V.（1995）Effect of strawberry density on dispersal of *Colletotrichum acutatum* by simulated rain. Phytopathology, 85: 934～941.

Brown, A. E. and Swinburne, T. R.（1980）The resistance of immature banana fruits to anthracnose［*Colletotrichum musae*（Berk. & Curt.）Arx.］. Phytopath. Z., 99: 70～80.

Brown, W.（1922）Studies in the physiology of parasitism. Ⅸ. The effect on the germination of fungal spores of volatile substances arising from plant tissues. Ann. Bot., 36: 285～300.

Buchwaldt, L., Morrall, R. A. A., Chongo, G. and Bernier, C. C.（1996）Windborne dispersal of *Colletotrichum truncatum* and survival in infested lentil debris. Phytopathology 86: 1193～1198.

築尾嘉章（1990）テンサイ炭そ病に関する研究．北海道農試研報，154：1～52．

中国農業百科全書編集部編（1987）中国農業百科全書蚕業巻，pp. 185，農業出版社，北京．

Citernesi, A.S., Fillppi, C., Bagnoli, G. and Giovannetti, M.（1994）Effect of the antimycotic molecule iturin A2 secreted by *Bacillus subtilis* strain M51, on arbuscular mycorrhizal fungi. Microbiol. Res., 149: 241～246.

Cooksey, D. A. and Moore, L. W.（1980）Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. Phytopathology, 70: 506～509.

Correll, J. C., Morelock, T. E., Black, M. C., Koike, S. T., Brandenberger, L. P. and Dainello, F. J.（1994）Economically important diseases of spinach. Plant Dis., 78: 653～660.

Delcambe, L.（1965）L' Iturin. Bull. Soc. Chim. Belges., 74: 315～328.

Dillard, H. R. and Cobb, A. C.（1993）Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York state. Plant Dis., 77: 1233～1238.

Dillard, H. R. and Cobb, A. C.（1998）Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. Plant Dis., 82: 235～238.

Dimmond, A. E. and Waggoner, P. E.（1953）On the nature and role of vivotoxins in plant disease. Phytopathology, 43: 229～235.

Dyko, B. J. and Mordue, J.E.M.（1979）CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No.630.

Eastburn, D. M. and Gubler, W. D.（1992）Effects of soil moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis., 76: 841～842.

Elad, Y., Kohl, J. and Fokkema, N. J.（1994）Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. Phytopathology,

84: 1193～1200.

Emmett, R. W. and Parbery, D. G.（1975）Appressoria. Ann. Rev. Phytopathology, 13: 147～167.

Furuya, N., Okamoto, T., Kori, Y., Matsuyama, N. and Wakimoto, S.（1991）Control of bacterial seedling rot of rice by avirulent strains of *Pseudomonas glumae*. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 57: 371～376.

Garbay-Jaureguiberry, C., Roques, B. P., Delcambe, L., Peypoux, F. and Michel, G.（1978）NMR conformational study of iturin A, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. FEBS letters, 93: 151～156.

Gohbara, M., Hyeon, S.-B., Suzuki, A. and Tamura, S.（1976）Isolation and structure elucidation of colletopyrone from *Colletotrichum nicotianae*. Agr. Biol. Chem., 40: 1453～1455.

Gohbara, M., Kosuge,Y., Yamasaki, S., Kimura, Y., Suzuki, A. and Tamura, S.（1978）Isolation, structures and biological activities of colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. Agric. Biol. Chem., 42: 1037～1043.

Govindaiah, T. Philip, K., Sengupta, K., Giridhar, and Suryanarayana, N.（1990）Incidence of leaf spot disease in relation to epidermal and cuticle thickness in some indigenous varieties of mulberry. Sericologia, 3: 257～260.

Gross, E., Kiltz, H.H. and Nebelin, E.（1973）Subtilin, Ⅳ: The structure of subtilin. Z. Physiol. Chem., 354: 810～812.

Grove, J. F., Speake, R. N. and Ward, G.（1966）Metabolic products of *Colletotrichum capsici* : isolation and characterisation of acetylcolletotrichin and colletodiol. J. Chem. Soc.（C）., 230～234.

原　摂祐（1925）実用作物病理学，pp. 148～149，養賢堂，東京.

原　摂祐（1936）日本害菌学，pp. 300～301，養賢堂，東京.

原　摂祐（1942）実験作物病理学，pp. 318～319，養賢堂，東京.

原　摂祐（1951）実験活用病虫害宝典，pp. 154～155，養賢堂，東京.

原　摂祐（1954）日本菌類目録，p. 400，日本菌類学会，岐阜.

Hasselbring, H.（1906）The appressoria of the anthracnose. Bot. Gaz., 42: 135～142.

畑田清隆・伊東祥太・佐藤　修（1990）イモチ病菌胞子発芽抑制能を有する環状ペプタイドの生理活性について．日本化学会化学系学協連合東北地方大会講演要旨集：219.

畑中顯和（1988）みどりの香り，中央公論社，東京，230pp.

平井篤造・浅田泰次・西村正暘・井上忠男（1989）最新日本植物病理学概論，養賢堂，東京，247pp.

Horie, Y., Nakasone, S., Watanabe, K., Nakamura, M. and Suda, H.（1985）Daily ingestion and utilization of various kinds of nutrients by silkworm, *Bombyx mori*（Lepidoptera: Bombycidae）. Appl. Ent. Zool., 20: 159～172.

堀江博道・飯島　勉・佐藤豊三（1990）伊豆諸島および小笠原諸島において採集された炭そ病菌とその宿主植物．菌研報，28：267～274.

池上八郎（1984a）植物糸状菌病の防除［17］．農業および園芸，59：1059～1064.

池上八郎（1984b）植物糸状菌病の防除［18］．農業および園芸，59：1199～1203.

今堀和友・山川民夫（1984）生化学辞典，東京化学同人，東京，1532pp.

石川金太郎（1922）日本蚕桑文献目録，pp. 1～78，大日本蚕糸会，東京.

石川成寿・中山喜一・常見譲史（1992）イチゴ炭そ病潜在感染株の簡易判別方法．日植病報，58：580.

Isogai, A., Takayama, S., Murakoshi, S. and Suzuki A.（1982）Structures of β-amino acids in antibiotics iturin A. Tetrahedron letters, 23: 3065～3068.

Iyozumi, H., Komagata, T., Hirayae, K., Tsuchiya, K., Hibi, T. and Akutsu, K.（1996）Biological control of cyclamen gray mold（*Botrytis cinerea*）by *Serratia marcescens* B2. Ann. Phytopath. Soc. Jpn., 62: 559～565.

片桐幸逸・小林昭三（1992）桑における縮葉細菌病圃場抵抗性の品種間差異．蚕糸昆虫研究，6：51～64.

片桐幸逸（1995）クワを育てる，“昭和農業技術発達史第４巻　畜産編／蚕糸編”（農林水産省農林水産技術会議事務局編著），pp. 506～512，農文協，東京．

木村勝太郎（1979）原色日本桑樹病害図説，建帛社，東京，163pp.

木村和義（1987）作物にとって雨とは何か，農文教，東京，197pp.

木曽　皓（1986）うどんこ病・炭そ病菌の生態と防除，“病原菌の生態からみた野菜の病害防除”，pp. 28～35，タキイ種苗，京都．

小林紀彦（1994）シクラメン炭そ病に対する品種間差異，病原菌の性質，感染と伝搬，ならびに薬剤感受性．九病虫研会報，40：75～81．

小林享夫（1993）*Colletotrichum*属－植物炭そ病菌－．防菌防黴，21：215～224．

河野又四（1965）チャ赤葉枯病に関する研究　特に外観健全なチャ樹新梢における病原菌の潜在性について．近畿大食品科学研特報，1：1～66．

小山朗夫（1993）採椹用桑品種の育成と利用．蚕糸科学と技術，32(6)：48～50．

Leaver, F. W., Leal, J. and Brewer, C. R.（1947）Nutritional studies on *Pyricularia oryzae*. J. Bacteol., 54: 401～408.

Lenne, J.M.（1992）*Colletotrichum* Diseases of Legumes. In “*Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control”（Ed. Bailey, J.A. and Jeger, M.J.）, pp.134～166, C.A.B. International, Wallingford.

牧野富太郎（1986）原色牧野植物大図鑑（本田正次編）p. 906，北隆館，東京．

Mari, M., Guizzardi, M. and Pratella, G. C.（1996）Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. Biol. Control, 7: 30～37.

宮城　博（1929）桑病の新種　桑樹赤葉枯病に就て．病虫害雑誌，16：111～113．

Muirhead, I. F. and Deverall, B. J.（1981）Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. Physiol. Plant Pathol., 19: 77～84.

Muncie, J. H.（1917）Experiments on the control of bean anthracnose and bean blight. Mich. Agric. Coll. Exper. Stn. Bull., 38.

直井利雄（1995）クワを育てる，“昭和農業技術発達史第４巻　畜産編／蚕糸編”（農林水産省農林水産技術会議事務局編著），pp. 495～505，農文協，東京．

Nicolson, R. L.（1992）*Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and sorghum. In “*Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control”（Ed. Bailey, J.A. and Jeger, M.J.）, pp.186～202, C.A.B. International, Wallingford.

日本植物病理学会編（1990）日本有用植物病名目録第１巻　第３版，pp. 117～127，日本植物病理学会，東京．

西村正暘（1970）毒素，“感染の生化学－植物－”（平井篤造・鈴木直治編著），pp. 292～318，農業技術協会，東京．

Ohra, J., Morita, K., Tsujino, Y., Tazaki, H., Fujimori, T., Goering, M., Evans, S. and Zorner, P.（1995）Production of phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Biosci. Biotec. Biochem., 59: 113～114.

奥　八郎（1993）病原性とは何か，pp.35～47，農文協，東京．

小貫拓実（1988）桑の残条利用による“シルキー（ひらたけ）”栽培．蚕糸科学と技術，27(8)：36～39．

大内成志（1990）植物感染生理学の歴史的展望，“植物感染生理学”（大内成志・西村正暘編著），pp. 1～10，文永堂，東京．

Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. C., Varenne, P. and Lederer, E.（1973）Isolement de L’acide 3-amino 12-methyl tetradecanoique et de L’ acide 3-amino 12-methyl tridecanoique a partir de L’ iturin, antibiotique de *Bacillus subtilis*. Tetrahedron, 29: 3455～3459.

Peypoux, F., Guinand, M., Michel, G., Delcambe, L., Das, B. C. and Lederer, E.（1978）Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. Biochemistry, 17: 3992～3996.

Podile, A. R. and Prakash, A. P.（1996）Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. Can. J. Microbiol., 42: 533～538.

Prusky, D. and Plumbley, R. A.（1992）Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In

“*Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control”（Ed. Bailey, J. A. and Jeger, M. J.）, pp. 289～307, C.A.B. International, Wallingford.

Sasaki, K.（1977）Materials for the fungus flora of Japan（26）. Trans. mycol. Soc. Jpn., 18: 343～345.

佐藤豊三（1993）炭そ病菌の分類と同定，“ 平成４年度果樹課題別研究会資料　落葉果樹の近年における発生動向と防除対策 ”，pp. 29～42，農林水産省果樹試験場，つくば.

Sawada, K.（1959）Descriptive Catalogue of Taiwan（Formosan）Fungi Part Ⅳ. Spec. Publ. Natl. Taiwan Univ., 8: 172.

Sengupta, S., Banerjii, A. B. and Bose, S. K.（1971）γ-Glutamyl and D- or L- peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. Biochem. J., 121: 839～846.

志田正二（1981）化学辞典，森北出版，東京，1518pp.

Simmonds, J. H.（1965）A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Qd. J. Agric. Anim. Sci., 22: 437～459.

白田　昭（1984）桑の生産する抗菌性物質を追って．蚕糸技術，124 ：41～47.

白田　昭（1991）紫外線照射や病原菌等によるクワ葉におけるファイトアレキシンの誘導．日植病報，57 ：420.

白田　昭（1995）クワを育てる“ 昭和農業技術発達史第４巻　畜産編／蚕糸編 ”（農林水産省農林水産技術会議事務局編著），pp. 519～524，農文協，東京.

白田　昭（1996）桑病害発生の危険性とその対策．蚕糸技術，152 ：18～23.

Slepecky, R. A. and Hemphill, H. E.（1992）The genus *Bacillus*-Nonmedical. In “The prokaryotes second edition”（Ed. Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H.）, pp.1687～1688, Springer-Verlag, New york.

Sneath, P. H. A.（1986）Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In “Bergey’s manual of systematic bacteriology Volume 2”（Ed. Sneath, P. H. A.）, pp. 1104～1138, Williams and Wilkins, Baltimore.

染谷信孝・曾我慎一郎・押田聡子・中島雅己・渡邊健・平八重一之・土屋健一・日比忠明・阿久津克己（1998）*Serratia marcescens* B2株によるイネ紋枯病のバイオコントロール－接種法と薬剤併用による防除効果の増強－．日植病報，64 ：604.

Sutton, B. C.（1980）“The Coelomycetes - Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata”, pp. 523～538, Commonw. Mycol. Inst., Kew.

Swinburne, T.R.（1983）Quiescent infections in post-harvest diseases. In “Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables”（Ed. Dennis,C.）, pp.1～21, Academic Press, London.

正田　誠（1991）土壌病害拮抗菌の生化学．土肥要旨集，37 ：197～198.

高橋幸吉（1988）作物病害事典（岸國平編著），pp. 165～166，全国農村教育協会，東京.

冨山宏平・酒井隆太郎・高桑　亮（1962）病原菌の生理，“ 植物病理実験法 ”（明日山秀文・向秀夫・鈴木直治編著），pp. 335～380，日本植物防疫協会，東京.

塚本雅俊（1998）桑の多用途利用の研究と実例．第110回日本蚕糸学会関東支部例会（桑関係）講要：1～4.

梅沢浜夫・芝　哲夫・滝田智久（1976）微生物のつくる生理活性ペプチド，共立出版，東京，396pp.

Utkhede, R. S. and Smith, E. M.（1992）Promotion of apple tree growth and fruit production by the EBW-4 strain of *Bacillus subtilis* in apple replant disease soil. Can. J. Microbiol., 38: 1270～1273.

Verhoeff, K.（1974）Latent infections by fungi. Annu. Rev. Phytopathology, 12: 99～110.

Vizvary, M. A. and Warren, H. L.（1982）Survival of *Colletotrichum graminicola* in soil. Phytopathology, 72: 522～525.

Walker, J. E. and Abraham, E. P.（1970）Isolation of bacilysin and a new amino acid from culture filtrates of *Bacillus subtilis*. Biochem. J., 118: 557～563.

渡辺四志栄・遊佐富士雄・早坂七郎（1989）桑新品種春切り桑葉の硬度の季節的変化．東北蚕糸研報，14 ：42～43.

Welker, N. E. and Campbell, L. L.（1967）Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. J. Bac-

teriol., 94: 1124～1130.
山本和太郎（1960）日本産の炭疽病菌の種名と属名の改変．植物防疫，14：49～52.
山岡直人・小林一成・久能均（1989）オオムギ子葉鞘細胞の認識機構（Ⅷ）物理的処理を施したオオムギ子葉鞘細胞への*Erysiphe pisi*の単独感染．日植病報，55：92.
山岡直人・小林一成・久能　均（1990）オオムギうどんこ病菌感染系に及ぼすUVの影響．日植病報，56：33.
柳川弘明・渡辺喜二郎・中村匡利（1988）原蚕の壮蚕用飼料の改善．蚕試報，132：49～61.
吉田滋実・吉田重信・白田　昭（1995a）桑炭そ病の褐変斑形成に対する桑の品種間差異．蚕糸昆虫研報，12：13～30.
吉田重信・白田　昭・吉田滋実・小林享夫（1995b）クワから分離した炭そ病菌*Colletotrichum dematium*，*C. acutatum*，*Glomerella cingulata*とその病原性．日植病報，61：75～81.
吉田重信・白田　昭（1996a）クワ炭疽病菌の各種植物に対する病原性．日蚕雑，65：86～93.
吉田重信・白田　昭（1996b）クワに対する各種炭疽病菌の病原性．日蚕雑，65：94～101.
吉田重信・白田　昭（1997）クワ炭疽病菌*Colletotrichum dematium*の分生子発芽に対するクワ葉成分の影響およびクワ葉上での感染初期形態観察．蚕糸昆虫研報，18：79～96.
Yoshida, S. and Shirata, A.（1998a）Induction of nitrate non-utilizing mutants of mulberry anthracnose fungi, *Colletotrichum acutatum* and *Glomerella cingulata*, and their pathogenicity. J. Seric. Sci. Jpn., 67: 205～210.
Yoshida, S. and Shirata, A.（1998b）Annual development of mulberry anthracnose caused by *Colletotrichum dematium* in relation to position of leaves in tree. J. Seric. Sci. Jpn., 67: 327～332.
Yoshida, S. and Shirata, A.（1998c）Severe infection of seedlings in a nursery bed caused by mulberry anthracnose fungus, *Colletotrichum dematium*. J. Seric. Sci. Jpn., 67: 373～379.
Yoshida, S. and Shirata, A.（1999a）Survival of *Colletotrichum dematium* in soil and infected mulberry leaves. Plant Dis., 83 : 465～468.
Yoshida, S. and Shirata, A.（1999b）The mulberry anthracnose fungus, *Colletotrichum acutatum*, overwinters on a mulberry tree. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 65: 274～280.
Yoshida, S., Hiradate, S., Fujii, Y. and Shirata, A.（2000a）*Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. Phytopathology, 90: 285～291.
Yoshida, S., Murakami, R., Ichihashi, T. and Yazawa, M.（2000b）Changes in the susceptibility of mulberry leaves applied differing amounts of fertilizer to phytopathogenic fungi. J. Seric. Sci. Jpn., 69: 305～311.
Yoshida, S. and Shirata, A.（2000）Biotin induces sporulation of mulberry anthracnose fungus, *Colletotrichum dematium*. J. Gen. Plant Pathol., 66: 117～122.
Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A.（2001）Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathology, 91: 181～187.

Ⅻ Summary

Mulberry anthracnose is a disease commonly observed in mulberry fields in Japan, of which symptoms consist of brown to red necrotic spots or streaks on the leaves. The incidence of the disease has tended to increase presumably due to dense planting of the trees and that mechanical harvesting of the shoots that results in significant damage to tree vigor. However, physiological and ecological studies leading to establishment of effectual control strategies against the disease had not been hitherto reported. In this paper, the author extensively studied about mulberry anthracnose and the causal pathogen. The following summarized the studies.

1）Anthracnose fungi were isolated from diseased mulberry leaves which were collected from various geographic origins in Japan. They were identified as *C. dematium*, *C. acutatum* and *Glomerella cingulata* based on the shape

and size of conidia. *C. morifolium* Hara, an anthracnose fungus hitherto described on mulberry, was proposed to be a synonym for *C. dematium* due to the morphological characteristics of the conidia. *C. dematium* was more frequently isolated than the other anthracnose species and showed strong pathogenicity on detached mulberry leaves. It is therefore suggested that *C. dematium* is the major anthracnose pathogen of mulberry, while *C. acutatum* and *G. cingulata* seem to be minor and the development of the lesions by the two pathogens strongly depend on the condition of the host.

2）Pathogenicity of the 3 species of mulberry anthracnose fungi, *C. dematium*, *C. acutatum* and *G. cingulata*, was examined using various detached leaves of plants belonging to 37 species of 21 families. Each fungus was pathogenic to various plants as well as to the mulberry. When 26 isolates of anthracnose fungi isolated from 15 plants were inoculated to mulberry leaves, *C. dematium* isolated from mulberry leaves showed the strongest virulence to the leaves, although other isolates belonging to several species also displayed lesions on the leaves by wound-inoculation.

3）Difference in the susceptibility of 260 mulberry cultivars to *C. dematium*, were studied. Several cultivars, such as “Chousa” and “Hikojirou” , were notably susceptible to the fungus. Whereas, some cultivars, such as “Gunmaakagi” and “Yamatowase”, were resistant to the fungus.

4）Development of mulberry anthracnose caused by *C. dematium* was surveyed in trees at a fixed point from August to November over a period of 2 or 3 years in mulberry field. Disease was observed only in lower foliage of trees in August, and the disease subsequently reached the middle and upper foliages in later months, resulting in the increase in the total number of diseased leaves until November. Inoculation tests in the field revealed that younger leaves attached at upper positions of a vertical shoot tended to be sensitive to the pathogen, suggesting that infection is less affected by the age of hosts leaves, but is more related to the position of attachment of leaves. Overwinter survival of *C. dematium* in the form of conidia and within infected leaves was examined in soil under field condition. Viability of conidia rapidly declined, and the survival could not be detected after 65 days of incubation, suggesting that conidia in soil are not a significant form of overwintering inoculum. While the fungus in infected or latently infected leaves placed in soil under field conditions survived long period. These results suggest that *C. dematium* can overwinter in infected or latently infected leaves, and that these leaves can be a source of primary inoculum in the following year.

5）Conidial germination and appressorial formation of *C. dematium* was examined on mulberry leaves and on glass slides in association with some leaf components of host and non-host plants. The percentage of conidial germination was higher on mulberry leaves than in water droplets on glass slides. Water-soluble and volatile compounds extracted and trapped from mulberry leaves, and decoction of dried mulberry leaves, induced the conidial germination. While the compounds obtained from leaves of non-host plants also induced the germination, suggesting that the germination-inducing compounds are host-nonspecific. The time required for penetration in mulberry leaf tissues was estimated to be 15-18 hours after inoculation.

6）When apparently healthy leaves of mulberry were irradiated with ultra-violet rays（UV）for 3-5 min. and kept in a moist chamber, brownish gray and orbicular spots often appeared on the leaves. Many acervuli, conidia and setae of *C. dematium* were produced on the spots. Thus, it is confirmed that *C. dematium* latently infects in mulberry leaves, and the latency is unmasked by irradiation of UV.

7）Compounds in mulberry leaves inducing sporulation of *C. dematium* were detected. Dissolved or suspended aqueous solutions（1%）of 16 amino acids and 10 vitamins occurring in mulberry leaves were applied individually at the margin of the fungal colony growing on PSA plate. Sporulation was induced only where a biotin solution was applied on the mycelium at a concentration of at least 0.01 ppm. This result suggests that biotin, which occurs in mulberry leaves（ca. 0.6 mg/kg of dried leaves）, has a

role in inducing sporulation of *C. dematium*.

8）*C. dematium* was examined to produce phytotoxins in planta. Extracts obtained from the fungus grown on mulberry leaves caused brown necrotic lesions on susceptible mulberry leaves, when they were placed on the wounded adaxial surface. Whereas, no extracts obtained from various media induced the necrosis, suggesting that the fungus produced phytotoxins in planta, and some components consisting in mulberry leaves may be indispensable substrates for producing the toxins. The phytotoxins obtained from the diseased leaves induced necrosis on nonhost plants leaves, as well as on mulberry leaves. In addition, the susceptibility to the toxin was correlated with that to the fungus infection in each susceptible or resistant mulberry cultivar. These results suggest that the phytotoxins are host-nonspecific but play a role as a factor of the fungal pathogenesis in mulberry leaves in the development of the lesions. Four toxic compounds were isolated and purified from the anthracnose lesions. However, due to the low yield, the chemical structure of the compounds could not be identified.

9）A potential antagonist, *Bacillus amyloliquefaciens* strain RC-2, against *C. dematium* was obtained from healthy mulberry leaves by the application of in vitro and in vivo screening techniques. Application of culture filtrate of RC-2 inhibited disease on mulberry leaves, indicating that suppression was due to antifungal compounds in the filtrate. Development of mulberry anthracnose on mulberry leaves was inhibited only when the culture filtrate was applied before fungal inoculation, and it was not inhibited by application after inoculation. These results suggest that the antifungal compounds in the filtrate exhibit a preventive effect on the disease. The culture filtrate of RC-2 also inhibited the growth of several other phytopathogenic fungi and bacteria in vitro. From the culture filtrate of RC-2, 7 kinds of antifungal compounds were isolated by HPLC analysis, and they were determined as iturin derivatives by NMR and FAB-MS analyses.

[生物研研究資料 No. 1：79-98 (2002)
Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Sci.]

イネcDNAマイクロアレイ実験プロトコール

藤井文子[1)*]，真保佳納子[1)]，矢崎潤史[1)*]，岸本直己[2)]，菊池尚志[2)]

(2002年4月10日受理)

Synopsis

The Microarray Project of MAFF was started in April, 1999. Here we describe the protocols for cDNA microarray experiments used in the research project. This manual will provide useful information to help researchers understand and perform microarray experiments.

Key words: Microarray, Gene expression, Transcription, Functional genomics, Protocol, cDNA, Rice, *Oryza sativa*

目　次

緒　言 …… 80
Ⅰ．マイクロアレイとは …… 80
1．マイクロアレイとDNAチップ …… 80
2．cDNA マイクロアレイ実験の概略…… 80
Ⅱ．cDNAマイクロアレイプロトコール集…… 81
1．マイクロアレイ作製のためのcDNA調製…… 81
(1) 大腸菌MTP (Micro Titer Plate) の準備 …… 81
(2) ヒットピッキング …… 82
(3) プラスミド抽出 …… 82
(4) 抽出したプラスミドの電気泳動による
チェック …… 82
(5) PCR …… 82
1) 抽出インサート全長のPCRによる増幅 … 82
2) 3'UTRのPCRによる増幅 …… 83
(6) PCR産物の精製 …… 83
(7) 精製PCR産物の電気泳動による確認 …… 83
(8) 精製DNAの濃度調整 …… 83
(9) 精製DNA サンプルの 96MTPから384MTP
への移し替え …… 83
2．スポッターの使用法 …… 84
3．マイクロアレイ実験に用いるRNAの調製
について …… 85
4．ターゲットの調製 …… 86
(1) 一色蛍光法 …… 86
(2) 二色蛍光法 …… 86
5．ハイブリダイゼーション …… 87
6．スライドガラスの洗浄 …… 87
7．スキャニング …… 88
(1) Array Scanner GenerationIIIでスキャンす
る場合 …… 88

1) 農林水産先端技術研究所（STAFF研究所）研究第一部，305-0854　茨城県つくば市大字上横場字一杯塚446-1
* 現：農業生物資源研究所　分子遺伝研究グループ，305-8602　茨城県つくば市観音台2-1-2
2) 農業生物資源研究所　分子遺伝研究グループ，305-8602　茨城県つくば市観音台2-1-2

（2）FLA-8000でスキャンする場合 …… 89
８．画像データの数量化 …… 89
（1）Array Gauge（Windows版，FUJIFILM社製の解析ソフトウェア）…… 90
（2）MicroArray Suite（Mac版，M&S機器製の解析ソフトウェア）…… 92
（3）ArrayVision（Windows版, Molecular Dynamics社製の解析ソフトウェア）…… 94
９．その他 …… 96
謝　辞 …… 97
摘　要 …… 97
参考文献 …… 97
引用文献 …… 98
Summary …… 98

緒　言

ゲノム研究は，近年，技術的な進歩と共に，急速な進展を見せている．現在までに，原核微生物から真核高等生物に至る諸生物で，ゲノムDNAの一次構造が決定されてきた．最も重要な農作物の一つであるイネについても，農林水産省農業生物資源研究所と農林水産先端技術研究所の共同研究プログラム「Rice Genome Research Program」が中心となって，ゲノム構造の解明を推進している．また，ゲノム構造解明の進展に伴い，新規遺伝子や機能未知遺伝子が数多く存在することが明らかになってきた．こうした背景のもと，最近になって，大量の遺伝子に関する転写レベルでの機能を短時間のうちに解析できる，“マイクロアレイ”と呼ばれる技術が開発された．農林水産省では，1999年４月より，21世紀グリーンフロンティア研究「遺伝子発現モニタリング手法を用いたイネ・ゲノム有用遺伝子の機能解明」（略称：マイクロアレイプロジェクト）を開始した．2000年度現在，マイクロアレイプロジェクト参画研究グループは，農林水産省の研究機関に加え，公立研究所・国立大学の他，私立大学・企業を含めて，計64グループに達している．筆者らは，マイクロアレイプロジェクトで使用されるcDNAマイクロアレイの作製・利用に関するシステムを構築してきた．本稿は，本プロジェクトにおけるマイクロアレイ実験の基本的な作業手順を紹介したものであるが，本プロジェクト構築過程での経験から得られたノウハウも含まれている．この小編が，本プロジェクト参画者やマイクロアレイに興味を持つ研究者のための“マイクロアレイ実験の手引き”，或いは，マイクロアレイ実験に対する理解の一助，となれば幸いである．

本グループでは，マイクロアレイプロジェクトのウェブサイトを開設した（http://microarray.rice.dna.affrc.go.jp/）．マイクロアレイ実験のフローチャートや，機器類等の写真など，本稿には掲載されていない情報が参照出来る．本編を読み進めるに当たって，このウェブサイトを参照して頂ければ，本稿の内容がより容易になるはずである．

Ⅰ．マイクロアレイとは

１．マイクロアレイとDNAチップ

一般に，DNAを直接スライドガラス等の上にスポットした（張り付けた）ものが，マイクロアレイと呼ばれている．本稿で紹介するのは，cDNAクローン（もしくは，そのインサート部分のPCR産物）をスライドグラスにスポットしたcDNAマイクロアレイである．

一方，DNAチップとは，ガラス等の支持体上で合成された約25塩基のオリゴヌクレオチドをプローブとして有するものである．

（マイクロアレイとDNAチップという名称は，ほぼ同義語，或いは，一方が他方を包含する関係にある名称，として使用されることがある．なお，本稿では，これ以降，DNAチップについては触れない．）

２．cDNAマイクロアレイ実験の概略

マイクロアレイ実験には，「２つの流れ」があり，これが後に「１つの流れ」となる（ウェブサイト参照）．「２つの流れ」とは，cDNAマイクロアレイを作製する

過程と，解析用サンプルRNAを調製・加工する過程，即ち，研究対象の生物からRNAを抽出・精製・蛍光標識する過程である．前者の過程では，大量のDNAクローンを扱うために，ロボットシステムの使用など，殆どの作業が，通常スケールの実験とは異なってくる．一方，後者の過程における作業は，質的にも量的にも，通常の分子生物学・分子遺伝学的実験と大差ない．

そして，これら「２つの流れ」の産物が，共に一つの実験過程で供試される．すなわち，前者の過程で作製されたマイクロアレイと，後者の過程で調製されたターゲット*（蛍光標識された核酸**）とのハイブリダイゼーションが行われる．

この後，スキャナーでマイクロアレイ上の蛍光シグナルが測定され，蛍光強度を反映した画像データとして記録され，更に画像データが数量化データに変換される．最終的に，数量化データを用いて，サンプル間における転写レベル・転写パターンの変動が比較解析される．

＊なお本稿では，サンプルRNAから調製した蛍光標識核酸を，「ターゲット」と称する．この場合，マイクロアレイ上のcDNAは，「プローブ」と呼ばれる．（研究者によっては，これらの呼称を正反対に用いる場合がある．）

＊＊本稿でも後段で紹介するが，一般に，マイクロアレイ実験における“サンプルRNAの標識（ラベリング）”とは，“サンプルRNAと蛍光色素を用い，逆転写酵素反応によって，蛍光標識されたcDNAを合成すること”である．もちろん，サンプルRNAのなかには，解析対象生物で発現していた多数の遺伝子から由来したmRNAsが含まれており，従って，ここで蛍光標識されたcDNAは，多数の遺伝子から由来したcDNAsの集団である．

つまり，

ターゲット

＝解析サンプルRNAから合成された蛍光標識cDNAs

＝解析対象生物で発現していた多数の遺伝子からのcDNAs集団（蛍光標識済み）

ということである．（Ⅱ.4.を参照）

Ⅱ. cDNAマイクロアレイプロトコール集

緒言でも述べたように，このプロトコール集は，農林水産省マイクロアレイプロジェクトで使用されている，イネの独立9000cDNAクローンを利用したマイクロアレイの作製・使用を念頭において作られたものである．本研究グループによる実際の作業手順を基に作られているため，異なるシステムに応用するためには，或る程度の変更や工夫が必要になると思われる．これらのことを念頭に置きつつ，以下，読み進めて頂ければ幸いである．

１．マイクロアレイ作製のためのcDNA調製

マイクロアレイ作製に必要なcDNAクローンを調製するためには，多くの行程，すなわち，大腸菌のレプリカ作製，レプリカ大腸菌から独立クローンのヒットピック，プラスミド抽出，PCR，PCR産物の精製，電気泳動，濃度測定・調整，96MTPから384MTPへの移動等が存在するが，特別難しい行程は無い．しかしながら取り扱うクローン数が非常に多く，それぞれのDNA量も多いため，作業の効率・精度を高めるには様々な工夫をすることが重要である．以下，手作業の場合と，自動システム（レールロボットシステム「ジェネシス」テカン社製）の場合とを併記する．

（1）大腸菌MTP（Micro Titer Plate）の準備

スタートサンプルは，イネ発現遺伝子群（EST：網羅的に単離・解析されたcDNAクローン）が導入された４万以上の大腸菌クローンである．（イネ発現遺伝子群はプラスミドpBluescriptにクローニングされており，大腸菌株NM522が形質転換に用いられた．保存形態は，グリセロールストックである．）

まずはじめに，これまでにRGP（Rice Genome research Program）で得られた全オリジナルクローンが保管されている独立型DWP＊（Deep Well Plate）約500枚から，各DWPをそれぞれ２枚のMTPにコピー（つまり約500枚から成るセットを２セット作製した：それぞれを，マザーコピー，ワーキングコピーと称する）を作製した．MTPへの培地の分注は，手作業の場合，電動デジタル

ピペット（EP-250/RAININ社）とMトレイ-1（ステム社/P01MSD）とBM-8-1200用チップ（BM機器／126-96RS）を使用し，各ウェル140μlずつ分注した．培地には1/2TB（６％グリセロール含有）を使用した．培地分注後，オートクレーブ滅菌済みのレプリカ作成用96連スタンプ（MS機器）を使用し，植菌を行った（火炎滅菌再使用はせず，１回植菌毎にオートクレーブ滅菌を行う．即ち，レプリカ作成用96連スタンプ１回使用で１個の独立型DWPのコピーを行う）．自動システムの場合New Protocol1を使用してこれら一連の行程を行う．コピー後MTPはシールなしでフタだけをした後，ラップで２重に包み37度で１晩静地培養した．包み方が悪いと，蒸発して培地が無くなってしまうので注意する．

次のヒットピッキング行程には，ワーキングコピーを使用する．マザーコピーは-80℃保存し，極力使用しない．

［* RGPのオリジナルクローンは，独立型DWP（845-TPS，QSP社）に保管されている．しかし，このタイプのDWPでは，各wellがそれぞれ独立したチューブになっているため，1000μl tipを使用してコピー作製をする際，tipを上下させる行程で，独立したチューブがtipと共に上下してしまい，ともすると，チューブがDWPから外れて倒れたり，その中のクローンがこぼれたりする危険が生ずる．従って，ブロック型DWP（２ml アッセイブロック96ウェル，Coster社/cat. No. 431140）の使用を推奨する．またMTPにはMicrotiter plate（Falcon社/ 3072）を使用している．］

(2) ヒットピッキング

一晩静地培養したワーキングコピー（500牧）から，マイクロアレイに使用するユニーククローン（約9000クローンMTP 94枚分）を選抜し，それらを，ユニーククローン用MTP（Destination MTP）へ並び替える行程である（ユニーククローン選抜基準についてはYamamoto and Sasaki（1997））．先ず，前項と同様の方法で，Destination MTPへ培地の分注を行い，手作業の場合は，滅菌した爪楊枝で使用ユニーククローンのウェルに触れた後，順序に従ってDestination MTPへ立てて行く．自動システムの場合は，Worklistを使用して本行程を行う．Destination MTPの培養は，前項と同様の方法で一晩静地培養する．

(3) プラスミド抽出

Destination MTP（ユニーククローンMTP）の各クローンからプラスミドを抽出する行程である．手作業の場合，まず培地を１mlずつ，連続分注器（ディストリマン/GILSON社）を使用してDWP（２ml アッセイブロック96ウェル（Coster社/431140））に分注する．次に，レプリカ作成用96連スタンプを用いて，一晩静地培養したDestination MTPからDWPへコピーを取り，そのDWPをAir-pore Tape Sheet（QIAGEN）でシールした後，一晩37度で振とう培養する．一晩培養したDWPを30min，3000rpm（ベックマン社/Allegera6RK）で遠心し，上清除去後DWPをひっくりかえしたまますばやくキムタオル上で残りの培地を吸い取る．プラスミド抽出にはQIAprep96Turbo Mini prep Kit（QIAGEN）を使用した（詳細は当キット取扱説明書参照）．抽出したプラスミドはDWPに回収した（キアゲンのキット付属の回収プレートよりも扱いやすい）．自動システムの場合New Protocol3を使用して本行程を行う．

ここで抽出された各クローンのプラスミドは，後の行程でPCRテンプレート用に使われるが，各大腸菌クローンからのダイレクトPCRを行っても良く，特に問題は無い．我々の場合は，クローン配布用に各クローンのプラスミドが必要であるため，プラスミド抽出を行っている．

(4) 抽出したプラスミドの電気泳動によるチェック

電気泳動には，日本エイドー社製のゲノム解析用泳動装置（処理能はMTP８枚／１台）もしくはテカン社製のオート泳動システムを使用する．１μlのプラスミドを１％アガロースゲル／0.5×TBEバッファーで泳動した．

(5) PCR

PCRテンプレート用に抽出したすべてのプラスミドを10倍に希釈し，以下の条件でPCRを行った．

1）インサート全長のPCRによる増幅

我々はベクターにpBluescriptを用いていることから，インサート全長をPCRにより増幅させる際，1-2ngのプラスミドテンプレートに対しM13 RV primerとM4 primer（TAKARA社）を使用している．

反応系は以下の通り．

10×バッファー	5 μl
25mM $MgCl_2$	5 μl
2mM dNTP mixture	5 μl
20μM M4 primer	1 μl
20μM RV primer	1 μl
Plasmid template（1-2 ng；抽出プラスミドを10倍希釈したもの）	x μl
（他の試薬の濃度・液量により適宜変える）	
Taq polymerase	0.25 μl
Water	y μl
（他の試薬の濃度・液量により適宜変える）	
Total	50 μl

注意）ロボットシステムによりPCRを行う際は，調製した反応液にミネラルオイルを1-2滴加える．

PCR cycle:
94 ℃ for 1 min
94 ℃ for 1 min, 60 ℃ for 2 min, 72 ℃ for 2 min（29cycles）
72 ℃ for 10 min

2）3'UTRのPCRによる増幅

RGPではESTマップ構築のために，ユニーククローンの3'UTRを基に設計した，Upper primerとLower primerを作製している（遺伝子特異的プライマーセット：：Wu et al., 2002）．これらを有効に利用すると共に，マイクロアレイに用いられたESTクローンのうち，未だ遺伝子特異的プライマーのないものについては同様のプライマーセットを設計・作製し，3'UTRのPCRによる増幅を行っている．増幅サイズは平均約250bpである．（3'UTRとは，cDNA 3'端の非翻訳領域．）
反応系は以下の通り．

10×バッファー	5 μl
25mM $MgCl_2$	5 μl
2mM dNTP mixture	5 μl
20μM Upper primer	1 μl
20μM Lower primer	1 μl
Plasmid template（1-2 ng）	x μl
（他の試薬の濃度・液量により適宜変える）	
Taq polymerase	0.25 μl
Water	y μl
（他の試薬の濃度・液量により適宜変える）	
Total	50 μl

PCR cycle：
94 ℃ for 1 min
94 ℃ for 1 min, 60 ℃ for 2 min, 72 ℃ for 2 min（29cycles）
72 ℃ for 10 min

（6）PCR産物の精製

PCR終了後, QIAquick 96 PCR Purification Kit（QIAGEN）を使用し，PCR産物の精製をおこなった（詳細は添付説明書を参照）．プライマー等の除去，PCRバッファーの置換を行う（精製せずにマイクロアレイを作製すると，PCR産物に含まれるPCRバッファーが，ハイブリダイゼーション反応を阻害する，と言われている）．

（7）精製PCR産物の電気泳動による確認

精製したPCR産物すべてについて，2.5％アガロースゲルを用いて電気泳動を行い，PCRの成否を確認した．これら精製DNAサンプルの電気泳動には，前述の，日本エイドー社製のゲノム解析用泳動装置（処理能はMTP８枚／１台）もしくはテカン社製のオート泳動システムを使用する．

（8）精製DNAの濃度調整

精製PCR産物を分光光度計（測定波長OD_{260}）により濃度測定し，200fmol/μlに濃縮または希釈する．希釈は精製の際の溶出バッファーを使用し，濃縮は60 ℃の加熱により行う．その後，精製DNAをreagent D（DMSO reagent/Amersham Pharmacia 社）と以下の比率で混合（DNA+water : reagent D = 1：1になるように）．

DNA	48 μl
reagent D	162.5 μl
Water	114.5 μl

（9）精製DNAサンプルの96MTPから384MTPへの移し替え

濃度調整後，reagent Dとの混合が終了した精製DNA

サンプルを，384MTP（GENETYX社）に移し替える．その理由は，アレイスポッターが384MTP（GENETYX社）仕様であるため．この移し替えには，ピペットマンもしくは96ピンタイプの分注器を用いている．

２．スポッターの使用法

当研究グループでは，Array Spotter GenerationⅢ（Amersham Pharmacia社）を用いている．

使用前の準備：

スポッターがクリーンブース内に設置されている場合，クリーンブース内のほこりを取り除くためファンを回しておく．また，湿度を一定にするため（55％程度），加湿または除湿を行っておく．

スポッターの廃液ボトル内の液を捨てておく．また，MilliQ水，100％ EtOH，0.2M KOHのボトルにそれぞれの試薬を，スポッター内部の加湿用タンクにMilliQ水を，補充しておく．

注　意：

＊スポッター用のペンセット（pen set）の先端を乾燥させない．１つのペンセットには，12本の微細キャピラリーペンが直線上に並んで付いている．ペンの先端を乾燥させると，目詰まりを起こしやすくなる．

＊バーコードシールが曲がっているスライドガラスや傷のあるスライドガラスは，スポッティングに使用しない．

⑴　スポッターに接続している窒素ボンベの栓をあける．その後スポッター本体横にある白い弁を開けてスポッターに窒素を供給する．（スポッター本体横にあるNITROGENのメーターが９psiの値を指すまでボンベの栓をゆるめる．）（この加圧窒素は，スポッティングピンの洗浄の際，ピンの乾燥のために使われる．）

⑵　バキュームポンプのスイッチを入れ，スポッター本体横にあるVACUUMのメーターが25Hgの値を指すまで待つ．（この陰圧により，Slide Tray［後述］に置かれたスライドグラスを，スポッティングの際に固定・保持する．）

⑶　スポッターに接続しているコンピュータにインストールされているソフトウェア”Generation Ⅲ Array Spotter Control”を起動して，スポッターをイニシャライズする．（イニシャライズ中にマウス，キーボードなどに触れると，スポッターのアーム等が暴走し部品が損傷する可能性があるので，触れないようにする．）

⑷　メニュー画面になったらまず，Humidity Controlボタンを ONにして，スポッター内部が適湿（55％程度）になるよう調節する．

⑸　画面左側にあるRoad Slides/Plates をクリックし，小さなウィンドウを表示させる．この状態であればスポッターのドアが開閉できる（通常，スポッターがアクティブ状態の場合にはドアは開かないようになっている）．

⑹　スポッターのアームにペンセットを取り付け，付属のねじでしっかりと固定する．また，週１回程度，Park Station（Slide Trayの左側にある）内のMilliQ水を交換する（スポッター起動後の停止状態時に，アームに取り付けたペンセットの先端は，Park Station内の水中に保持される）．

⑺　スライドガラスをSlide Trayの左奥から右方向へ順に置いていく（Slide Trayには36枚分のスライドガラス用ユニット（４行×９列）がある）．スライドガラスのほこりをエアーダスター等の圧縮空気で除去し，バーコード面を自分側（手前）に向けて，各ユニットの左奥角にスライドの角を合わせてセットする．（スポッティング用スライドガラスの枚数が９の倍数以外の場合は，ダミーのスライドガラスを加えて９の倍数になるようにセットする．ユニット１行分（スライド９枚分）を単位にバキューム装置が働いているので，９の倍数になっていないと，スポッティング中にスライドを固定できず，各スポット液量の不均一やスポット間隔のずれ等が生ずる．）

⑻　あらかじめスピンダウンしておいた384穴プレート（プローブ用DNA入り）を，スポッター内の左側にあるMicroplate Elevatorへ，下から順に，プレートのＡ１が右奥にくるように（プレートの

バーコードを奥側に向けて）セットしていく．プレートを全て入れ終わったらMicroplate Elevatorの扉を閉め，次いでスポッターのドアをしっかりと閉める．

⑼ ⑷や⑸と同じ画面上にある，小さなウィンドウ内のReadyボタンをクリックする．

⑽ 同じ画面右側にあるManual Washをクリックしてペンセットの洗浄を行う．これを10回繰り返す．

⑾ 同じ画面のメニューOptionからSpotting Parametersを選択して，Spot Diameterを250μm，Spot Bufferを30μmに設定する．その後Optionから Spotter Set Upを選択し，plate数を12，Slide数を36，Well Setsを32，Spot/Dipを72に設定する．

⑿ 画面左側のStartボタンをクリックし，スポッターをスタートさせる．この際，Microplate Elevatorのドアが開いているなどのエラーがあった場合には，小さなウィンドウ（エラーメッセージ）が画面に現れる．エラーを解決した後，小さなウィンドウ内のStartをクリックすれば，スポッターは再始動する．384穴プレート12枚分をスライドガラス36枚にスポッティングする場合（１runでの最大処理能力），ほぼ４時間で終了する．［注］

⒀ Spotが終了したら，画面右側にあるManual Washをクリックしてペンセットの洗浄を行う．これを10回繰り返す．このあと画面左側にあるRoad Slides / Platesをクリックし，小さなウィンドウを表示させてからドアを開ける．ペンセットと384穴プレートをしまい，ドアを閉めてこの状態で約４時間放置してスライドガラス上のスポットを乾燥させる．

⒁ スポットが乾いたら遮光できるスライドガラスケースに乾燥剤とともに封入し，乾燥器の中に保存する．

⒂ “GenerationIII Array Spotter Control”を終了してスポッター本体横にある，白色の弁と窒素ボンベの栓を閉め，真空ポンプのスイッチを切る．

［注］スライドガラス上のスポットの分布：

本スポッター（12本ペン）の最大スポッティング数は，スライド１枚当たり4608スポット×2反復＝合計9216スポットである．この場合，１枚のスライド上では，

（12本のペン）×（1本のペンで同一クローンが2反復）

というスポッティングパターンが，384回繰り返されることになる．

その結果，1枚のスライドグラス上におけるスポットの分布は，次のようになる：

24個のFieldが12行×2列に並ぶ；1個のFieldには，384スポットが12行×32列に配列している．（24×384 = 9216クローン）

著者らが作製しているイネ9000 cDNAアレイでは，スライドガラス２枚のほぼ全面にわたってcDNAがスポッティングされている．

３．マイクロアレイ実験に用いるRNAの調製について

マイクロアレイ実験に適した，特別なRNAの調製法というものは無い．厳密な比較検討は行っていないが，CTAB法，グアニジン法，SDS/フェノール法など，異なる抽出方法に起因する，実験結果の差異は無いと思われる．重要なことは，（或る程度）精製度の高いRNAであること，つまり，抽出したRNAにタンパク質・多糖類・実験試薬等の不純物・不要物が残留していないこと，逆転写酵素でcDNAが作られる程度に精製されていること,である．抽出したサンプルについて，分光光度計による測定結果（O.D.260/O.D. 280やO.D. 260/O.D. 230の値）が満足のゆくものであっても，電気泳動をして（或いは，Agilent Technologies/Caliper TechnologiesのLabChipシステムを用いて）RNAの存在と品質を確認しておくことを薦める．また，抽出・精製には，市販されているRNA抽出用キット類（QIAGENのRNeasy Kit等）の利用を推奨する．

なお，マイクロアレイ実験に供するのは，total RNAでもmRNAでもよい（次項４．参照）．一般的に，mRNAを用いた場合の方が，アレイ実験で得られる画像の蛍光強度が高い．

４．ターゲットの調製

(1) 一色蛍光法

ここでは，イネ9000 cDNAアレイ１セット分（２枚１組）のプロトコールを紹介する．

実験開始前の準備：

ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく．(37℃，42℃，70℃，95℃)

ハイブリオーブンを60℃にセットし，また，加湿状態にしておく．

注意事項：凍結保存している試薬類は氷上で溶かす．

1) 1.5ml tubeに，mRNA(もしくはtotal RNA)と，下記の試薬を混合して反応液を作り，スピンダウンする．

mRNA (+dH_2O*)	10 μl (2μgを含む)	—
Total RNA (+dH_2O*)	—	12 μl (40μgを含む)
Control RNA	10 μl	10 μl
Oligo-(dT)25	2 μl	2 μl
Random Nonamer Primer	2 μl	—
Total	24 μl	24 μl

(*RNAが上記カッコ内の質量になる様に，RNA濃度によってはdH_2Oを加え，上記の規定容量に調整する．)

2) 70℃で５分間プレアニーリングさせる．

3) 25℃(室温)で10分間インキュベートした後スピンダウンする．

4) 前項3)のtubeに，以下の試薬類を加えて緩やかにピペッティング後，スピンダウンする．

5× Super Script buffer	8 μl
0.1M DTT	4 μl
dNTP mix	2 μl
Cy5-dCTP* (もしくはCy3-dCTP)	2 μl
Super Script II**	2 μl
Total	18 μl

＊重要：Cy-dyeを加えた後は遮光すること

＊＊重要：Super Script IIは一番最後に加えること

5) 42℃・暗所で2.5時間反応させる．

6) 94℃・暗所で３分間加熱した後スピンダウンする．

7) 2.5M NaOHを４μl加えて混ぜる．

8) 37℃・暗所で15分間反応させる．

9) 2M HEPESを20μl加えて緩やかにピペッティング後，スピンダウンする．

10) QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)，或いは，GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia社) 等を用いて精製する．その後バキュームコンセントレーターでドライアップさせる．(この際バキュームコンセントレーターを遮光し，内部を暗所にしておく)

11) 前項10)のtubeに12μlのdH_2Oを加えてしっかりと溶かす．その後スピンダウンする．

12) 95℃・暗所で４分間加熱する．

13) 氷上・暗所で30秒間急冷し，スピンダウンする．

14) Oligo A80(1mg/ml)を３μl加えピペッティングした後スピンダウンする．

15) 70℃・暗所で45分間反応させ，スピンダウンする．

16) 軽く温めておいたExpressHyb (Clontech社) 45μl を加え，気泡をたてない様に緩やかにピペッティングし，混合した後スピンダウンする．

(2) 二色蛍光法

ここでは，イネ9000 cDNAアレイ１セット分（２枚１組）のプロトコールを紹介する．

実験開始前の準備：

ヒートブロックの温度をそれぞれセットしておく．(37℃，42℃，70℃，95℃)

ハイブリオーブンを60℃にセットし，また，加湿状態にしておく．

注意事項：凍結保存している試薬類は氷上で溶かす．以下の操作はCy3用とCy5用それぞれのチューブを用意し行う．

1) 1.5ml tubeに，mRNA(もしくはtotal RNA)と，下記の試薬を混合して反応液を作り，スピンダウンする．

mRNA (+dH_2O*)	10 μl (2μgを含む)	—

Total RNA（+dH_2O*）	—	12 μl （40μgを含む）
Control RNA	10 μl	10 μl
Oligo-（dT）25	2 μl	2 μl
Random Nonamer Primer	2 μl	—
Total	24 μl	24 μl

（*RNAが上記カッコ内の質量になる様に，RNA濃度によってはdH_2Oを加え，上記の規定容量に調整する．）

2）70℃で５分間プレアニーリングさせる
3）25℃（室温）で10分間インキュベートした後スピンダウンする．
4）前項3）のtubeに，以下の試薬類を加えて緩やかにピペッティング後，スピンダウンする．

5×Super Script buffer	8μl
0.1M DTT	4μl
dNTP mix	2μl
Cy3-dCTP*	2μl
もしくはCy5-dCTP	
Super Script II**	2μl
Total	18μl

＊重要：Cy-dyeを加えた後は遮光すること
＊＊重要：Super Script IIは　一番最後に加えること

5）42℃，暗所で2.5時間反応させる．
6）94℃，暗所で３分間加熱した後スピンダウンする．
7）2.5M NaOHを４μl加えて混ぜる．
8）37℃，暗所で15分間反応させる．
9）２M HEPESを20μl加えて緩やかにピペッティング後，スピンダウンする．
10）QIAquick PCR Purification KIT（QIAGEN）を用いて精製する．
11）前項10）で精製，溶出したCy3とCy5のサンプルを１本のチューブにまとめる．その後バキュームコンセントレーターでドライアップする．（この際バキュームコンセントレーターを遮光し，暗所にしておく）
12）前々項10）に９μlのdH_2Oを加えてしっかりと溶かす．その後スピンダウンする．
13）95℃，暗所で４分間加熱する．
14）氷上，暗所で30秒間急冷し，スピンダウンする．
15）Oligo A80（1mg/ml）を６μl加えピペッティングした後スピンダウンする．
16）70℃，暗所で45分間反応させ，スピンダウンする．
17）軽く温めておいたExpressHyb（Clontech社）を45μl加え，気泡をたてないように緩やかにピペッティングで混合した後スピンダウンする．

５．ハイブリダイゼーション

実験開始前の準備：
ハイブリダイゼーションの前に，マイクロアレイをUVクロスリンクしておく（50000μJ/cm^2）．（UVクロスリンクをしなくても実験結果には殆ど影響がない，と言われている．）クロスリンクしたマイクロアレイは，極力早く使用し，長期保存しない．

（1）スライドガラスとカバーガラスの表面のほこりなどを圧縮空気（エアーダスター）で除去する．前項（16）の半量（30μl）を１枚目のスライドガラスの端に滴下し，滴下した側の端から徐々にカバーガラスをかぶせる．（注意事項：この際，気泡が入らないように十分注意する．また，一度のせたカバーガラスを動かさないようにする．）
（2）残りの半量（30μl）を２枚目のスライドガラスに滴下し，同様にカバーガラスをかぶせる．
（3）タッパーなどの密閉できる容器にキムタオルやスポンジを置き，60℃程度のお湯をしみ込ませる．その上に台座を置き，カバーガラスをかぶせたスライドガラスを乗せる．容器の蓋をしっかりと閉めて密閉状態にする．
（4）60℃・暗所・加湿状態（ハイブリオーブン使用）で４時間ハイブリダイズさせる．

６．スライドガラスの洗浄

洗浄前の準備：
２種類の洗浄液（1×SSC, 0.2％ SDSと0.1×SSC, 0.2％ SDS）を55℃に温めておく．
ハイブリオーブンを55℃にセットしておく．

(1) 黒色のウォッシュボックス（＝スライドグラス用ラック入り，ふた付きの，遮光可能な洗浄用の箱）へ，55℃に温めた１×SSC, 0.2％ SDSを十分量入れる．
(2) タッパーなどの口の広い容器（約15cm×約20cm）に，55℃に温めた１×SSC, 0.2％ SDSを入れる．その液中にスライドガラスを浸してカバーガラスを剥がし，(1)のウォッシュボックス内のラックに手早く入れる．この際，ガラスが，ラック内でなるべく等間隔になる様に入れていく．蓋をして，55℃・暗黒下で10分間穏やかに振とうする．
(3) 別のウォッシュボックスに，55℃に温めた0.1×SSC, 0.2％ SDSを入れ，その中に (2) のラックを手早く移し．蓋をして，55℃・暗黒下で10分間穏やかに振とうする．
(4) 別のウォッシュボックスに，55℃に温めた0.1×SSC, 0.2％ SDSを入れ，その中に (3) のラックを手早く移し，蓋をして，55℃・暗黒下で10分間穏やかに振とうする．
(5) 別のウォッシュボックスに室温の0.1×SSCを入れ，(4)のラックを手早く移して，液中でラックを10回程度上下させて洗う．
(6) 別のウォッシュボックスに室温の0.1 x SSCを入れ，(5)のラックを手早く移して，液中でラックを10回程度上下させて洗う．
(7) 別のウォッシュボックスに室温のMilliQ水を入れ，その中に(6)のラックを手早く移して，水中でラックを5回程度上下させてリンスする．
(8) 室温に設定したプレート用遠心機で900～1000rpm，４分間遠心して，スライドガラス上の水気を除去する．この後に，スキャニングする．

７．スキャニング

(1) Array Scanner GenerationIIIでスキャンする場合

このスキャナー(Molecular Dynamics社，Amarsham Pharmacia社)には，スライドグラス用カートリッジと，カートリッジをセットするためのマガジンが付属しており（Amarsham BS社のウェブサイトの写真参照），これらを用いてスライドグラスをスキャニングする．

1) スキャナー，コンピューターの順に電源を入れて，立ち上げる．
2) ソフトウェア“Array Scanner Control”を起動して，スキャナーをイニシャライズする
3) イニシャライズ終了後，スキャナーから，マガジンを取り出す．
4) スライドガラス上のほこりを，エアダスターなどで取り除く．
5) スライドカートリッジを，Ω字型の切り込みが手前，スライドストッパーが左側になるように，一方の手で保持し，ストッパーのすぐ手前のバネを押しながら，スライドガラスを所定の位置にセットする．この際，スポット面を上に，バーコードをΩ型切り込みと反対側にする．
6) カートリッジを，スポット面を上にしてマガジンに入れる．カートリッジは，マガジンの最下段からサンプル番号順に入れていくのが望ましい（スキャニングは，マガジン最下段から始まるため)．
7) ｉ）マニュアルモードでスキャンする場合

“Array Scanner Control”の初期画面で，Scanner ModeをManualにする．

“File”メニューから，“Scan Set up”を選ぶ．この画面で，Slide AreaからFull Slideを選択し，次いでScan Parameters（使用波長，スキャンする範囲，どのスライドガラスをスキャンするか等）を設定する．Doneボタンをクリックすると初期画面に戻るので，スタートをクリックする．セーブウィンドウが表示されるので，画像データをセーブするファイル名を入力し，OKボタンをクリックするとスキャニングが始まる．

ii）オートモードでスキャンする場合

“Array Scanner Control”の初期画面で，Scanner ModeをAutoにする．そのままスタートボタンをクリックすると，スキャニングが始まる．この場合，自動的にガラス全体のスポットが２波長（Cy5, Cy3の２色分）でスキャンされる．画像データの保存も自動的に行われ，保存ファイルの名前はバーコードナンバーとなる．もしバーコードを読み取れない場合は，「Slide○○」（＝「○○枚目にスキャンしたスライド」）という名前になる．

8) 一色蛍光法の画像データは，２つのフォルダ（そ

れぞれに２ファイルずつを含む）と，フォルダなしの２つのファイルに，保存される．

先ず，２つのフォルダ，○○○.dirと○○○b.dir，についてだが，フォルダ○○○.dirには，○○○.dsと○○○_L_1.GELという２ファイルが，一方，フォルダ○○○b.dirには，○○○b.dsと○○○_R_1.GELという２ファイルが，それぞれ入っている．これは１枚のスライドガラスを左側と右側にわけてスキャンしているためである．○○○_L_1.GELが左側の，○○○_R_1.GELが右側の画像になる．

フォルダなしの２つのファイルは，○○○.dsと○○○b.dsで，これはフォルダ内の同名のファイルと全く同じものである．

（参考：２色蛍光法の画像データをスキャンする場合，オートモードでは，Cy３→Cy５の順でスキャンされ，○○○_L_1.GELにCy３の画像，○○○_L_2.GELにCy５の画像が，保存される．マニュアルモードでは，Cy５→Cy３の順でスキャンされ，○○○_L_1.GELにCy５の画像，○○○_L_2.GELにCy３の画像が，保存される．また，”Image Quant”というソフトを用いれば，○○○.dsで左側の，○○○b.dsで右側の２色重なった画像を見ることが出来る．）

9）スキャニングが終了したら“Array Scanner Control”を終了し，スキャナーの電源を切る．

（2）FLA-8000でスキャンする場合

FLA-8000（FUJIFILM社製スキャナー）では，Array Scannerよりもスライドガラスのセッティング操作が簡便である．スライドキャリア（最大スライド５枚セット可能）にスライドガラスを挿入し，スライドキャリアごと本体にセットすればよい．

1）スキャナー，コンピューターの順に電源を入れて，立ち上げる．

2）ソフトウェア“Image Reader FLA-8000 v1.12”を立ち上げ，スキャナーのウォーミングアップを行う．

3）スキャナーから，スライドガラス用キャリアーを取り出し，取っ手側を下にして置く

4）エアダスターなどでスライドガラス上のほこりを取り除く．スライドをキャリアーにセットする際には，スポット面を上にして，バーコード側の端を持って，キャリアーに挿入する．その後，キャリアーをスキャナー内にしっかりとセットし，スキャナーの蓋を閉める．

5）“スキャンコンディション”（即ち，“レゾリューション”を‘10 μm’に，“スキャンモード”を“ハイセンス.”にセット），“エリア”（“マックス”ボタンを押して，最大範囲にセット）を設定する．“レーザー”の波長とスキャンするスライドガラスの枚数を設定する．（前もって画像データの質を確認するために，“プレスキャン”をしても良い.）Scanボタンをクリックするとスキャンがスタートする．スキャン終了後，Saveボタンをクリックし，画像データをセーブする．

6）セーブされた画像は１画像につき，１つのファイルと１つのフォルダが１セットで作られる．このファイルには，Back up情報（或いはSet up情報）が含まれており，ファイル名は“ここで１セットになっているフォルダ名.set”である．一方，フォルダの方には，○○○－○.img，○○○－○.inf，Info.setという３つのファイルが含まれている．なお，○○○－○. imgなどの“－○”の部分には，スキャンに使用したレーザーの波長が表示される．例えば，Cy5の波長でスキャンした場合は○○○－635.imgというようになる．（参考：“Image Reader”の古いversionである“Image Reader MAS-0”のFileプルダウンメニュー中にある“Convert to TIFF”を用いれば，imgファイルをtifファイルに変換することが可能である．）

7）スキャンが終了したら“Image Reader FLA-8000 v1.12”を終了し，スキャナーの電源を切切る．

８．画像データの数量化

本グループで使用経験のある３種類の数量化ソフトウェアについて，以下，それぞれの使用法を記述する．なお，(1)のソフトウェアには，日本語による詳しい操作ガイドと取扱説明書 [詳細な操作方法を含む] が付属している．(2)と(3)のソフトウェアについては，今のところ英語版の取扱説明書だけであり，日本語の説明書は用意されていない（2000年末現在）．

［本節で使用する言葉の定義：
Template：蛍光シグナル強度を測定・定量化するための領域を定める枠組．遺伝子情報ファイル：マイクロアレイ上のクローンのナンバリング，クローンID，accession No.，等の情報を含んだファイル．］

（1）Array Gauge（Windows版，FUJIFILM社製の解析ソフトウェア）

STAFF研究所作製のイネ9000 cDNAアレイによって得たデータを数量化する場合は，あらかじめ，イネ9000 cDNAアレイ用Template，及び，当該スポットに関する遺伝子情報ファイルをインストールしておく．インストールの詳細についてはFUJIFILM社のArray Gauge担当者に問い合わせられたい．

なお，個別のケースで新たにTemplateを作製する場合は，その詳細な操作手順が，本ソフトウェアの操作ガイドと取扱説明書（いずれも日本語版）に記されているので，御参照頂きたい．

1）ArrayGauge v1.31を起動する．画面上部に解析手順の項目が，フローチャートとして表示される．この順序に従って，解析を進めてゆく．画面左側パネルにも，現在の解析項目と次の項目（左側パネル最下段ボタン）が示される．

（a）.imgファイルの場合：画面上部のImageアイコンボタンをクリックし，画面左側パネルのTrimingボタンをクリックする．小さなウィンドウ，“ファイルを開く”，が表示される．この小ウィンドウから解析するimgファイルを選択する．そして“開く”というボタンを押すと，このウィンドウは“Triming”という小ウィンドウに切り替わる．この“Triming”ウィンドウ下方の，階調調節用グラフ（Range Scope）右端にある緑色の垂線をドラッグしながら，画像の濃淡・色調を調節する．フォルダアイコンから未解析画像ファイルを選択した場合は，左側のパネルのRangeScopeボタンをクリックしてTrimingウィンドウを表示させ，ここで述べた方法で階調調節をする．（注：ここで画像の階調・濃淡を変更してもオリジナルな蛍光強度は変化しない．従って，最終的な測定結果には影響を与えない．）→Displayアイコンボタンへ．

（b）.tifファイルの場合：画面上部のImageアイコンをクリックし，画面左側パネルのTrimmingボタンから．tifファイルを選択して開く．小さなウィンドウが開くので，ここでRange Scopeを調節し，別のファイル名をつけてセーブする．→Displayアイコンボタンへ．

2）画面左側パネル最下段にあるDisplayアイコン，または，画面上部にあるDisplayアイコンをクリックする．左側パネル内で，Scaleがexponentialになっていることを確認する．アレイ画像の微調節を行うためには，画面左側パネル下方にある階調調節用グラフの，緑色の垂線をドラッグしながら，画像の濃淡・色調を調節する．（注：ここで画像の階調・濃淡を変更してもオリジナルな蛍光強度は変化しない．従って，最終的な測定結果には影響を与えない．）→Measureアイコンボタンへ．

3）画面左側パネル下方にあるMeasureアイコン（または，画面上部にあるMeasureアイコン）をクリックする．左側パネル内のSelectからイネ9000 cDNAアレイ用のTemplateを１つ選択してOKボタンをクリックすると，選んだTemplateがアレイ画像上に表示される．画像データとテンプレートの対応を間違えないように注意する（例えば1stスライドガラスの画像データに2ndスライドガラス用のテンプレートを使用すると後で数量化が終了したテキストデータに1stスライドガラス用のcDNA情報を添付できなくなる．この際はもう一度テンプレートをつけ直して３）からやり直すことになるので要注意）．

4）左側パネル内の，３つ横に並んだ正方形のFittingボタンのうち左２つと，上方にある手型ボタンとを駆使してTemplateを移動させ，スポットの位置に大まかに合わせてからAuto Optionをクリックする．すると小さいウィンドウ（AutoFitting Parameters Option）が表示される．この中のBlock Alignment Typeをindependentに，Spot Alignment Sensitivityを４（ないしは３）に設定し，Spot Appearanceをそのスポッティング状態（スポットがドーナッツ状か否か）に合わせて選択し，Centering Parameterを３（ないしは４）に設定して，Autoをクリックする．この操作によって，Templateがスポットに自動的に当てはまるよう調整される．Templateがスポットとずれた箇所は手で修

正し（場合によっては，もう一度Auto Optionを繰り返す），最終的にTemplateを全てのスポットに上手く当てはめる．

（オプション　1：Positive Controlスポットの設定は，この段階で行う．左側パネル内のChoiceボタンを使ってPositive Controlのスポットを選択し，次に，Attributeボタンをクリックしてスポット属性をControlに変更する．Positive ControlスポットのTemplateが緑色に変わる．）（オプション　2：Global Backgroundのための領域設定は，この段階で左側パネル内のBackgroundボタンを使って行う．10）参照．）→Analysisアイコンボタンへ．

5）画面左側パネル下方にあるAnalysisアイコン，または，画面上部にあるAnalysisアイコンをクリックする．１つの画像ファイルを解析した場合は，３枚のウィンドウ（即ち，既に５）で開いていたアレイ画像の他に，スポット蛍光強度の測定結果表，各スポットの濃度分布を示したパターン画像）が，画面に現れる．２つの画像ファイルを解析した場合は，７枚のウィンドウ（即ち，アレイ画像２枚と，それぞれのパターン画像［２枚］，スポット蛍光強度の測定結果の表１枚，パターン画像を比較したCompare Window １枚，そして２つの測定結果を比較したスキャッタープロット１枚）が，画面に現れる．それぞれのウィンドウ上のスポットとデータは相互にリンクしている（しかし，スキャッタープロット上の各点から，他のウィンドウへの方向には，リンクがない）．

6）アレイ上のcDNAに関する情報を，測定結果表に加えるためには，先ず，測定結果表ウィンドウをアクティブにして左側パネル内のcDNA info.ボタンをクリックする．小さなウィンドウ（cDNA Info）が表示されるので，その中のselectボタンをクリックして，あらかじめインストールしておいた遺伝子情報ファイルから，当該測定結果表に対応するファイル（例えば，イネ9000 cDNAアレイ前半スライドの結果ならば，ファイルRice9000FullArray1-stInfo）を選択してOKボタンをクリックする．小さなウィンドウの左側に，その情報ファイルに含まれる諸項目が表示されるので，先ず，その中のElement No.のみを選択しAddボタンをクリックしてIndex Matching Informationへ移動させる，次いで，Add allボタンをクリックして，残りの遺伝子諸情報すべてをGene Information to Displayへ移動させる．最後にOKをクリックすると，結果表内へ各スポットに対応した遺伝子情報が表示される．

7）左側パネル内のMeasure Optionボタンをクリックすると小さなウィンドウ（名称：Measure Option）が表示される．ここから，BackgroundやNormalizationの設定が出来る（Backgroundの設定はRange Optionからでも可能．10）参照）．（Normalizationとしては，しばしば，Global Normalizationが行われている．Positive controlを使うと上手くNormalization出来ない場合が多い．）

8）測定結果表をアクティブにして，左側パネル内のTable Optionボタンをクリックすると小さなウィンドウ（名称：Table Option）が表示される．ここでは測定結果やクローンの情報を，No.やIndexの順（いずれも昇順のみ），Densityの順序（測定値の降順）やRatioの順序に従って並べ替えることができる．Ratioの場合は，２サンプル間のデータ比率を，降順（Ratio（down）ボタンをクリック），もしくは昇順（Ratio（up）ボタンをクリック）で表示できる．また，List AmountでAllボタンを選択すると，全てのクローンのデータと情報を，一方，Topボタンを選択してから表示したいデータ数を入力すると，その数だけのデータと情報を最高値データから降順で表示することができる．List ChoiceでSelectionsを選択すると，結果表内にあるStatusにO.K.と入力されたクローンだけをリストアップする．（入力には，Status欄をクリックするだけで良い）

9）アレイ画像をアクティブにして左側パネル内のRange Optionボタンをクリックする．十字型に変化したカーソルで，その画像上の任意のスポットをクリックすると，小さなウィンドウ（名称：Range Option）が表示される．ここではバックグラウンド領域，測定濃度域を調整できる．我々は以下の（a）の設定を用いて解析を行っている．

（a）Display modeをOut-Lineにし，Limit Density Rangeの空欄はそのままにしておき（チェックをいれない），Peak Noise Reductionの空欄はクリックしてチェックマークを入れる（Limit Density Rangeの設定値は０％

のまま）．BackGroundでLocalボタンを選択し，BG Thicknessを３に，BG Spaceを０に設定する．OKボタンをクリックする．（注：ここでGlobal Back Groundを選択するためには，5）でBackground領域を設定しておく必要がある．） → Annotationアイコンへ．またはSaveアイコンへ（この場合は10）をとばして11）に進む．）

（b）［オプション］Display modeをOutLineにし，Limit Density RangeとPeak Noise Reductionの空欄をクリックしてチェックマークを入れる（Limit Density Rangeの設定値は０％のまま）．BackGroundでLocalボタンを選択し，BG Thicknessを３に，BG Spaceを０に設定する．OKボタンをクリックする．（注：ここでGlobal Back Groundを選択するためには，5）でBackground領域を設定しておく必要がある．）

10）画面左側パネル下方にあるAnnotationアイコンまたは画面上部にあるAnnotationアイコンをクリックする．左側パネル内のAアイコンを選択すればアレイ画像上に文字が，矢印アイコンを選択すれば矢印を入力することができる．→Saveアイコンへ．

11）左側パネル下方にあるSaveアイコン，または，画面上部にあるSaveアイコンをクリックする．ここで測定結果表をアクティブにし，Exportをクリックしてテキスト形式で保存する．またアレイ画像の場合は，Saveを選択するとimgファイルで，Exportを選択するとtifファイルまたはbmpファイルで保存できる．

（2）MicroArray Suite（Mac版，M＆S機器製の解析ソフトウェア）

このソフトウェアで解析できるのは，tifファイル形式のデータである．

使用前の準備：各スポットに関する遺伝子情報ファイルを作製しておく（下記４）（b）参照）．

1）数量化操作前の作業：マイクロアレイの蛍光画像は，バックグラウンドの高い領域（スライドグラス外縁付近に多く生ずる）やバーコード部分など，解析に不必要な，蛍光強度の極めて高い領域を含んでいる場合がある．MicroArray Suiteでは，アレイ画像上のスポットシグナル領域を切り取って，新しいファイルを作る（この作業をしないと，数値化が困難になる．）

ａ）MASbata21を立ち上げてfileから，解析したい画像のtifファイルをイメージを選択して開く．プルダウンメニューEnhanceからNormalizationを選択し，コントラストを調節する．ROIウィンドウの虫眼鏡アイコン（画像をクリックすれば画像は拡大され，Optionキーを押しながら画像をクリックすると縮小される）を選択し，スライドガラス全体が見えるように大きさを調整する．次に，Cutアイコンをクリックし，切り取りたい画像箇所を囲む．EditからCrop imageを選択すると，切り取りたい画像部分のみのイメージになる．

ｂ）ガラス上のゴミや汚れの数値を下げるためにEnhanceからMedian Filterを選択し，３×３ピクセルで２回ほどかける．何度もフィルターをかけるとスポット蛍光強度の測定数値に影響を及ぼすので注意する．

ｃ）FileからSave As...を選択し，この“切り取り画像”に，別のファイル名をつけて保存する．この画像を，以降の数量化解析に用いる．この画像のファイルもtif形式であるが，アイコンの形が，オリジナル画像のtifファイルとは異なっている．（注意：この画像をオリジナル画像と同じ名前で保存すると，オリジナル画像は失われるので要注意．）（参考：この画像を保存する際，名前の後ろに.tifという拡張子をつけておけば，Windowsでも開くことができる．）

ｄ）MASbata21を終了させる（この後再度立ち上げて，数量化を行う）．

2）［ここからが，数量化操作である．］MASbata21を立ち上げて1）で保存したtifイメージファイルを選択し，開く．EnhanceからNormalizationを選択し，コントラストを調節する．Enhanceからinvertを選択し，invert CLUTにチェックを入れOKをクリックする．これを行うとシグナルを黒く，バックを白く表示させることができる．（同じ動作を再度行うと反転した画像になる．）

3）Ext.からPlace Gridsを選択すると，前回最後に使用したGridとGrid Set upという小さなウィンドウが表示される．

4）新しくGridを作成する場合は以下の手順に従う．

(a) その小さなウィンドウ中のNewを選択すると，Confirm Saveという更に小さなウィンドウが表示される．その中でNoを選択し，アレイ画像のウィンドウ下方にあるClearGridsをクリックすると，それまで表示されていたGridが画面上から消える．

(b) Grid Set upウィンドウ中のLoad Gene Libraryから，使用する遺伝子ファイル（本項(2)の冒頭「使用前の準備」参照）を選択し，設定する．次に，スポッティングのパターンに合わせて，４つの項目（Super Grid Rows，Super Grid Columns，Sub Grid Rows，Sub Grid Columns）をそれぞれ設定する．［例：スライド１枚の全面にスポットされている場合は，Super Grid Rowsに12（Fieldの行数），Super Grid Columnsに２（Fieldの列数），Sub Grid Rowsに12（１Field内スポットの行数），Sub Grid Columnsに32（１Field内スポットの行数）を，それぞれ設定する．（スポッティングパターンやFieldについては，「Ⅱ．２．スポッターの使用法」の末尾にある［注］を参照のこと．）］カーソルを，アレイ画像のスポットの一番左上から，１Field分のスポットを囲む様にドラッグすると，残りのFieldに対応するGridも表示される．

5）Gridをスポットに合わせていく．個々のGridは全て相互にリンクしているため，左側のGridを動かすと右側のGridも連動して動き，上側のGridを動かすと下方のGridも連動して動く．従って，左側のGridから右のGrid，上側のGridから下方のGrid，という順序で，Gridをスポットに合わせていく．Grid間のリンクをはずすには，先ず，リンクをはずしたいFieldにカーソルを持っていき，そこでアップルマークを押しながらFieldをクリックすると，そのGridだけが青色に変化し，リンクをはずすことができる（この時，カーソルはチェーンのような形になる）．リンクを元に戻すには同じ操作を行えばよい．また，画像ウィンドウ下方にGrid Cell Modeボタンがあり，このモードでは，全Fieldの同じ場所のスポットを囲んでいるセルが全てリンクしていて，ひとつ動かせばそれ以下のものが全て同じように動く．リンクをはずすには上記の場合と同様にする．Gridのリンクをはずしたら，必ずリンクを元に戻しておく．また，Fieldの大きさを変えたいときはFieldの外枠にカーソルを合わせるとカーソルが矢印様に変わるので，ドラッグして大きさを調節する．作成したGridは必ず名前を付けて保存しておく．以上のような方法でGridをスポットに当てはめたら，画像ウィンドウ下方右側にあるOKをクリックする．

6）Ext.からProcess Arraysを選択し，Place Grid Setting内の項目内容のチェックを行い，Processing Specifics内のTarget sizeを10pixelsに，TypeをThresholdingに，weightを３に，Background SubtractionをLocalに，Intensity Average WithinをTargetに設定する．またTarget AnalysisがTarget Detection Onlyになっていることを確認してOKを押す．（この際，必ず日本語変換ソフトになっていないことを確認する．“ことえり”や“ATOK”のままだと強制終了される可能性があるので注意すること．）すると，３つのウィンドウ（元から表示されている画像，Processing Resultという名前の　イメージファイルとGridが重なっているウィンドウ，Sample Intensitiesという名前の測定結果表）が現れる．

7）Ext.からDisplay Array Dataモードを選択すると，２つのウィンドウ（Color imageとSample Intensities）が開く．Color imageでは，キーコードがキーボードと対応しており，例えばHを押すとキーコードのヘルプが表示される．Clone infoには，クリックしたスポットのデータが最大100個まで表示されるので，興味のあるスポットのデータだけを選び出すことができる．Qを押すかダブルクリックでDisplay Array Dataモードから出ることができる．Display Array Dataモードから出ないと他の作業（例えばセーブ）は行えない．また，一度Display Array Dataモードから出ると，再度入ることができないので注意する．

8）必要なデータをSave As...で保存する際，保存するファイルの名前には，全て別名を付ける．保存されたファイルは，全てMicro Array Suite専用の保存形式になる．(1)で作製した“切り取り画像”＝tifイメージファイルは，tifのまま．1）d）を参照）．Sample Intensitiesは，tab区切りでtext形式保存できるので，別名保存する際に.txtという拡張子をつけておけばWindowsでも開く事ができる．このtextファイルを

Microsoft Excelなどの表計算ソフトに落として，解析する．

9）以上，ここで紹介したソフトウェア“Micro Array Suite”では，１枚の画像ファイルから幾つものウィンドウが作成されてくる．従って，作業中は，各ウィンドウを，それぞれファイルとして保存しながら，解析してゆく方が安全である．（例えば，終了する際，プルダウンメニューのWindowからDispose all windowsを選択すると，そこに開いていた全てのウィンドウが閉じる，つまり，保存していないデータ等のウィンドウも閉じてしまう．）

（3）ArrayVision（Windows版，Molecular Dynamics社製の解析ソフトウェア）

1）“ArrayVision”を起動する．画面上部に示されるアイコンのうち，右端のアイコン（ArrayMacroボタン）をクリックすると，２つの小さなウィンドウが現れる．画面右側の，横長の小さなウィンドウ（Run［Array Macro］ウィンドウ）には，数量化する手順の各段階が示される（ここでは［Display Format］: Change display formatと表示）．同時に，画面中央には，Run［Display Format］ウィンドウ）が表示されるので，Image typeを16 bits（default），total # of channelsを４，total # of viewsを１に合わせ，OKをクリックする．

2）Run［ArrayMacro］ウィンドウには，［ARV Analysis setting］: ArrayVision channels and measure selectionと表示される．画面中央には，Run Macroウィンドウが示されるので，Analysis typeをExpression，Arrays/Templatesをsingle array，Template modeをsingle，Element valueをDens x Area，Backgroundをaverageに合わせ，チェックボックスには全てチェックを入れてOKをクリックする．

3）Run［ArrayMacro］ウィンドウには,“［Loading Image Set］: Load multiple images from files.”と表示される．画面中央には，Retrieve image setウィンドウが示される．このウィンドウ左側の欄に示されるファイルの中から，解析したいGELファイルを選択してAddボタンを押し，同ウィンドウ右下側の欄（Images to load）に表示させる．OKボタンをクリックする．

4）Loading Imageという小さいウィンドウ（ファイルが“Loading中である”ことを表示）が消えると，Image viewウィンドウが現れる．この中に先ほど選んだ．GELファイル（＝アレイ画像）が表示される．また，Run［ArrayMacro］ウィンドウには，“［Pause］: Cause macro execution ...（以下略）“という文とStopアイコンが表示される．これらの背後には，Visualsウィンドウが表示されている．

5）Visualsウィンドウ右上３番目のHistogramアイコン（Run［ArrayMacro］ウィンドウの後ろに隠れている）をクリックすると，Visualsウィンドウ右半分（＝LUT map）に蛍光シグナルのピクセル分布を示すヒストグラムが表示される．LUT mapの左下から右上に走る斜線（茶色）の両端をドラッグしながらＸ軸方向に沿って動かし，Image viewウィンドウの画像を見ながら，最適なコントラストに調整する．（Image viewウィンドウ内の画像の倍率は，このウィンドウの左上端アイコン（緑＆赤）のプルダウンメニューからmagnificationを選び，適宜，調節する．）

6）Run［ArrayMacro］ウィンドウのStopアイコンの下にある”Resume”ボタン（緑色で，点滅している）をクリックする．新たにTemplate Definition［Untitled］ウィンドウが現れる．このウィンドウでtemplateを作る（Templateとは，アレイ画像上のスポットに当てはめてシグナル強度を測定・数量化するための枠組）．

7）ｉ）既に適当なtemplateが保存されている場合：Template Definitionウィンドウの左上にあるfileのプルダウンメニューからOpenを選ぶと，保存されているTemplate filesが現れる．必要なtemplateを選び，OKボタンを押すと，Image viewウィンドウのアレイ画像にtemplate（多数の赤丸）が現れる．（templateと画像上のスポットがずれている場合は，Template DefinitionウィンドウからAlignmentメニューに入り，下のh）以降に記した要領で，templateをスポットに当てはめてゆく．）

Ⅱ）新規にtemplateを作製する場合：

ａ）Template definitionウィンドウ内のメニューからLayoutメニューを選ぶ．このメニューのChangeボタンをクリックする．

ｂ）３つの項目が現れる．Field selectionをmultipleに，Layer selectionをoneに合わせ，rowにはfieldの数（＝

使用したpenの本数），columnには1 field当たりのスポットの列数を入力してOKボタンをクリックする．

c）ａ）のLayoutメニューに戻る．Rowsにはスポットの全行数，Columnにはスポットの全列数を入力する．

d）アレイ画像上のスポットの直径を測る．別の小さなウィンドウLayout tool boxにある“A--B”ボタン（＝距離測定用ボタン）を押すと，カーソルで直線を引くことによって，２点間の距離測定が出来るようになる（起点からドラッグして終点で放すと，それら２点間の距離が測定される）．先ず，スポットの直径を測る．直径がRows或いはColumnの欄に表示されるので，その数値をDiameterの欄にキーボードから入力する．

e）次に，行・列方向のスポット間距離（interval）を測定する．（行のintervalとは，隣接した上下スポットの上端から上端まで［或いは下端から下端まで］の距離，列のintervalとは，隣接した左右スポットの左端から左端まで［或いは右端から右端まで］の距離）Intervalは，ｄ）と同じ要領で測定すれば，自動的にintervalの欄に入力される．

f）更に，Element欄のcircleを選んで，Createボタンをクリックする．

g）Element Starting Positionウィンドウが現れる．Templateの起点を決めるために，画像の左上端スポットをクリックする．画像にTemplate（多数の赤丸）が現れる．

h）［ここから，Templateをスポットに当てはめる作業］

Template definitionウィンドウ内のメニューからAlignmentメニューを選ぶ（templateをスポットに当てはめるためのメニュー）．Templateの外側に，緑色の方形をした枠（以下，緑枠と称す）が現れる．（Layout tool boxもAlignment tool boxに変わる．）

i）先ず，緑枠の左右の辺と上辺をドラッグして（カーソルは，矢印から両矢印に変化）templateの列がスポットの列に合うように調節する．

j）次に，緑枠の下辺を，キーボードのコントロールキーを押しながらドラッグし，最下行のtemplateが，最下行のスポットに合うように調節する（“コントロールキーを押しながら”ドラッグすることにより，field数に対応したtemplateが配置される．単に下辺をドラッグすると，templateは均等に広がる）．

k）緑枠が囲むtemplateの範囲は，容易に変更出来る．カーソルを１個のtemplateに合わせてクリックすると，緑枠は１個のtemplateのみを囲む．更に，シフトキーを押しながら，他のtemplateをクリックすると，クリックした２つのtemplateを囲む緑枠が出来る．同様の要領により，緑枠を任意の方形に変えて，templateを囲むことが出来る．

なお，緑枠内の全templateをそのまま移動させる場合は，カーソルを緑枠の左上端に合わせて（カーソルは矢印から十字に変化）ドラッグする．

また，カーソルを緑枠の右上端に合わせて（カーソルは弓形の両矢印に変化）ドラッグすると，緑枠内の全templateは，枠の左上隅を軸にrotateする．

更に，カーソルを緑枠内の四隅にあるtemplateの１つに合わせ（カーソルはV字型に変化）ドラッグすることにより，緑枠内のtemplateをスポットの位置に調整する方法もある．

l）緑枠内にあるスポットのシグナルが全体的に強い場合は，上記の要領で大まかにtemplateをスポットに合わせた後，Alignmentメニューの Autoalignmentボタンをクリックすることによって，緑枠内のtemplateとスポットを自動的に当てはめることが出来る．（しかし，シグナルが弱い場合には，Autoalignmentによって，かえってずれてしまうことがある．AutoalignmentのあとでUndoボタンを押せば，Autoalignmentをキャンセル出来る．）

m）それでもなおtemplateとスポットがずれている場合は，同じ画面上に現れている極小ウィンドウ（Alignmentウィンドウ）のindividual template移動アイコン（丸に矢印アイコン）をクリックした後，個々のtemplateをドラッグさせてスポットに合わせる．

n）Template definitionウィンドウから，Labelメニューを選ぶ．ここで，各スポットに番号を割り当てることができる（つまり，各スポットの並びと数量

化データの配列を対応させるための設定）．左側のアイコンで“行方向と列方向にそれぞれ番号をつける”，中央のアイコンで“最上の行から順に，左から右方向に，最下行まで通し番号をつける”，右側のアイコンで“縦方向に通し番号をつける”ことが出来る．

o）Template definitionウィンドウから，Backgroundメニューを選ぶ．Backgroundの設定位置を選ぶ項目が現れる（各テンプレートの外側に設定する；各スポットの外側に設定する；Negative control用スポット等を選ぶ；スポットのない領域の或る範囲を選ぶ）ので，どれか１項目を選択する．Defineボタンを押して，設定条件を入力する（入力する条件は，項目によって異なる）．使用アレイの設計などを考慮してbackgroundを設定する．

p）Template definitionウィンドウから，Anchor/Blankメニューを選ぶ．何もスポットをしていない箇所に対応するTemplate等をblankとして設定しておく．（そのTemplateについては数量化データが計算されない．）（o）やp）の作業中にtemplateが見えなくなるが，Refreshボタンを押し，templateを表示して，どの場所にbackgroundやblankが設定されたかを確認する．もし間違いが有ればClearボタンでクリアし，再設定する．）

q）作製した新規templateを保存するためには，Template definitionウィンドウ上側のFileプルダウンメニューからSave as ...を選び，ファイル名をつけてから保存する．

8）Template definitionウィンドウのOKボタンをクリックする．（注意：新規にtemplateを作製した場合，保存する前に，この操作を行うと，新規templateは失われてしまうので要注意．）ImageViewウィンドウは表示されたままで，Template definitionウィンドウとAlignmentツールボックスは消え，代わって画面左下にSampleツールボックスが現れる．（なお，或る段階に戻って，もう一度作業をやり直したい場合は，Run［Array Macro］ウィンドウの左下にあるアローヘッドボタンを操作することによって，各段階に戻ることが出来る．）

9）カーソルを，Image viewウィンドウの画像上に移動させ（カーソルは，４本の矢印からなる四角いカーソルに変わる），クリックすると，蛍光強度の数量化計算が始まる．データの一覧表は，Image viewウィンドウの背後に現れているDataウィンドウに表示される．

10）アレイ画像を見ると，ゴミやバックグラウンドがあるために，“データにならないスポット”が見つかる．こうした場合，計算終了後，Image viewウィンドウから“データにならないスポット”に目印（＝“旗”）を付けて区別しておくことが出来る．まず，画面上の極小ウィンドウ（Sampleウィンドウ）のFlagアイコン（右から２番目にある，Ｖアイコン）をクリックすると，カーソルがＶ字型に変わる．そして，各スポットに対応するtemplateをクリックすると，templateは自動的に赤色に塗りつぶされる（スポットに“旗”が付いた状態）．Dataウィンドウのデータ一覧表にも，そのスポットに対応する欄に“旗”が付く．

11）画面最上段のメニューバーからFileメニューを選び，その中のSave as...を選んで，ファイル名を付け，保存する．最終的な画像とデータ一覧表の両方が，ArrayVisionのファイル形式で保存される．また，同様にFileメニューからExportを選び，データ一覧表と同じ名前を付けて，Text形式としても保存しておく．この場合，データ一覧表は，先のArrayVisionファイル形式で保存されたデータ一覧表とは独立した別のファイルとして，Textファイル形式で保存される．

９．その他

“再現性”の確認：

蛍光強度の数量化が終了したら，スライドガラス内における，データの“再現性”を調べる．先ず，スポット蛍光強度の測定結果表をテキストファイルとしてexportする．そのファイルをExcelなどの表計算ソフトに落とし，一枚のスライドガラスについて，左右スポットセットのデータをスキャッタープロットする．数量化した蛍光強度が，２倍から0.5倍までの範囲（或いは，３倍から1/3倍までの範囲）に入っていれば，「“再現性”あり」と判断する．それ以上，或いはそれ以下の値を示したデータについては，以下のいずれかを行う：(1)アレイ実験結果を用いて

RNAサンプル間比較解析を行った後，それらの比較結果を必ず別の方法（RT-PCRやNorthern法など）によって確認する；(2) 或るアレイ実験に関して「“再現性”が非常に低い」と判断された場合，同一RNAサンプルを用いて再度アレイ実験を行う．(2)の場合でも，得られたアレイ実験結果を別の方法によって確認する．

Normalization：

一般に，中央値を利用する方法や，Global Normalization法が行われている．Positive controlをreferenceとして使うと，上手くnormalization出来ない場合が多い．理想的な方法として，internal positive controlとして，絶対に発現量の変化しない複数のhouse-keeping遺伝子（或いは，それらのcDNAs）をアレイ上から探し出し，それらのシグナルをnormalizationに用いる方法があるが，この方法では，実験毎に“internal positive controlとして使用する複数のhouse-keeping遺伝子”を見つけねばならない．

なお，我々は，positive control用クローンのシグナルを，“ハイブリ実験が成功したことの確認”のためにのみ使っており，データのNormalizationには用いていない．我々のイネcDNAアレイには，positive control用クローンとして，イネcDNAとクロスハイブリダイズしないブタESTクローンのインサートDNAがスポットされている（external positive control）．そして，ハイブリダイゼーション用ターゲットの調製時には，これらブタ由来クローンのcRNA（in vitro transcript）を各サンプルRNAと混合して同時に逆転写酵素反応を行っている．従って，画像データとして，イネcDNAクローンの蛍光シグナルと共に，positive controlのシグナルも得られる．

サンプル間のデータ比較解析：

発現変化の最も単純な判定法は，「比較するデータ間で，蛍光強度の比が“２以上”ならば“転写量の増加”を示し，また，“0.5以下”ならば“転写量の減少”を示す」と判定する方法である（或いは，“３以上”・“1/3以下”を基準に，判定する場合もある）．ただし，これらの基準には，統計学的な根拠が全く無いので，アレイ実験の結果をRT-PCRやNorthern法によって確認する必要がある．

比較解析で，最もシンプルな計算法は，前項で述べたように，exportしたデータをExcel等の表計算ソフトを用いて，蛍光強度の数量化データ間で比較する方法である．先述したソフトウェアの中では，Array GaugeやMicroArray Suiteに，ある程度の比較解析機能が含まれている．ここでは紹介しなかったが，既にSpotfire（spotfire社）（スキャッタープロット上の各点と，アレイ上の遺伝子情報が相互にリンク）やGeneSpring（Silicon Genetics社）（主成分分析等，統計学的手法を用いた比較解析も可能）など，幾つかの比較解析ソフトウェアが販売されている．

謝　辞

本プロトコールは，農林水産省21世紀グリーンフロンティア研究「遺伝子発現モニタリング手法を用いたイネ・ゲノム有用遺伝子の機能解明」（担当研究課題「イネの遺伝子群発現モニターシステムの開発」;課題番号　1000）のサポートによって作製された．

摘　要

本稿は，マイクロアレイプロジェクトで主に用いられている，イネcDNAマイクロアレイの作製・利用に関するプロトコール集である．大量のマイクロアレイ用cDNAの調製，スポッターの使用法，ターゲットの調整（＝RNAの蛍光標識法），ハイブリダイゼーション，スライドガラスの洗浄，蛍光シグナルのスキャニング，画像データの数量化に関するプロトコールが含まれている．本プロトコール集は，本プロジェクト参画者やマイクロアレイに興味を持つ研究者のための“マイクロアレイ実験の手引き”，或いは，マイクロアレイを理解するための一助になるであろう．

参考文献

マイクロアレイに関連したマニュアル・プロトコール集：筆者らが気付いた範囲内で記した．参考にされる

ことをお勧めする．

１）松村正明，那波宏之（監修） 2000．DNAマイクロアレイと最新PCR法．細胞工学別冊　ゲノムサイエンスシリーズ①　pp. 133.　秀潤社，東京．
２）辻本豪三，田中利男（編集） 2000．ゲノム機能研究プロトコール．実験医学別冊　ポストゲノム時代の実験講座①　pp. 269．羊土社，東京．
３）林崎良英（監修），岡崎康司（編集） 2000．必ずデータが出るDNAマイクロアレイ実戦マニュアル．pp. 174．羊土社，東京．
４）東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター（中村祐輔研究室）編集　2000．ラボマニュアルマイクロアレイ編．pp. 43．（非売品）

引用文献

１）Yamamoto K, Sasaki T 1997. Large-scale EST sequencing in rice. Plant Mol Biol. 35: 135-144.
２）Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T, Sasaki T 2002. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. Plant Cell 14: 525-535.

Summary

Protocols for experiments on rice cDNA microarray

Fumiko Fujii [1)]*, Kanako Shimbo [1)],
Junshi Yazaki [1)]*, Naoki Kishimoto [2)] and Shoshi Kikuchi [2)]

1) Rice Genome Research Program, STAFF-Institute. Ippaizuka, Kamiyokoba, Tsukuba 305-0854, Japan.
2) Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Sciences（NIAS）. Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

The Microarray Project of MAFF（Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan）was started in April 1999. Here we describe the protocols for microarray experiments used in this research project. This article, mainly on Rice 9000 cDNA Array, includes protocols for preparation of insert DNAs from cDNA clones as probes, usage of array spotter, preparation of targets from RNA samples, microarray hybridization, washing of microarray, scanning of fluorescent signals, and quantification of image data. The protocols will allow the participating researchers in the project as well as other researchers to perform their own microarray experiments and to understand the details on procedure in microarray experiment.

[Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Sci.
No. 1：99-119 (2002)]

Protocols for experiments on rice cDNA microarray

Fumiko Fujii [1)]*, Kanako Shimbo [1)], Junshi Yazaki [1)]*, Naoki Kishimoto [2)], Shoshi Kikuchi [2)]

(Received: April 10, 2002)

Synopsis

The Microarray Project of MAFF was started in April, 1999. Here we describe the protocols for cDNA microarray experiments used in the research project. This manual will provide useful information to help researchers understand and perform microarray experiments.

Key words: Microarray, Gene expression, Transcription, Functional genomics, Protocol, cDNA, Rice, *Oryza sativa*

Contents

Introduction …… 100
Ⅰ. What are microarrays? …… 100
1. Microarrays and DNA chips …… 100
2. Outline of a cDNA microarray experiment …… 100
Ⅱ. cDNA microarray protocols …… 101
1. Treatment of cDNA for microarray preparation …… 101
(1) Preparation of *E. coli* MTP (Micro Titer Plate) …… 101
(2) Hit-picking …… 102
(3) Plasmid extraction …… 102
(4) Checking of extracted plasmid by electrophoresis …… 102
(5) PCR …… 102
1) Amplification of the whole length of extracted insert by PCR …… 103
2) Amplification of 3'UTR by PCR …… 103
(6) Purification of PCR products …… 103
(7) Confirmation of purified PCR products by electrophoresis …… 103
(8) Adjustment of the concentration of purified DNA …… 103
(9) Transfer of purified DNA samples from 96MTP to 384MTP …… 104
2. Method for using the spotter …… 104
3. Treatment of RNA for microarray experiments …… 105
4. Target preparation …… 106
(1) One-color fluorescent method …… 106
(2) Two-color fluorescent method …… 106
5. Hybridization …… 107
6. Washing of glass slides …… 108
7. Scanning …… 108
(1) Scanning by Array Scanner Generation III …… 108

1) Rice Genome Research Program, STAFF-Institute. Ippaizuka, Kamiyokoba, Tsukuba 305-0854, Japan.
* Present address: Molecular Genetics Department, NIAS. Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.
2) Molecular Genetics Department, National Institute of Agrobiological Sciences. Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

（2）Scanning by FLA-8000 …… 109
8. Quantification of Image Data …… 110
（1）ArrayGauge（for Windows, Fuji Film's analysis software）…… 110
（2）MicroArray Suite（for Mac, M&S Instrument's analysis software）…… 113
（3）ArrayVision（for Windows, Molecular Dynamics' analysis software）…… 114
9. Others …… 118
Acknowledgement …… 118
Summary …… 119
Reference books …… 119
Reference …… 119

Introduction

Genome research has recently made rapid technical progress. The primary structures of genomic DNA have been determined from prokaryote microorganisms to higher eukaryotes. Concerning rice, which is one of the most important crops, the clarification of the genomic structure is being advanced primarily by the Rice Genome Research Program, which is a joint research program between two organizations affiliated to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries（MAFF）, namely, the National Institute of Agrobiological Sciences（NIAS）and the Institute of Society for Techno-Innovation of Agriculture, Forestry, and Fisheries（STAFF-Institute）. Also, with the further clarification of the genomic structure, the presence of many novel genes and genes with unknown functions has been recognized. With this background, the technique called "microarray", which allows rapid functional analysis of a large quantity of genes at the transcription level, has recently been developed. MAFF started the 21st Green Frontier Research, "Functional Clarification of Useful Rice Genes Using the Gene Expression Monitoring Technique"（referred to as the Microarray Project）in April, 1999. As of the year 2000, 60 research groups participated in the Microarray Project, including research organizations affiliated to the MAFF, public research institutions, national universities as well as private universities and private enterprises. We have created procedures for the preparation and usage of cDNA microarrays used in the Microarray Project. This report presents the basic procedures of microarray experiments in this project as well as the know-how obtained in the process of establishing this project. It is our hope that this paper serves as a "Manual for Microarray Experiments" and a reference for understanding of microarray experiments for the researchers who participate in this project and those who are interested in microarrays.

Our group opened a web site of the Microarray Project（http://microarray.rice.dna.affrc.go.jp/）, which provides information not included in this paper such as flow charts of microarray experiments and photographs of the instruments used. This web site may help the readers better understand the contents of this paper.

Ⅰ. What are microarrays?

1. Microarrays and DNA chips

Generally, DNA directly spotted on（attached to）a glass slide is called a microarray. This paper introduces the cDNA microarrays prepared by spotting cDNA clones（or the PCR products of their insert parts）on a glass slide. The DNA chip is a structure that has probes, or oligonucleotides each of which consists of about 25 bases synthesized on a support such as glass.（Although the terms "microarray" and "DNA chip" are sometimes used synonymously, the DNA chip is not discussed further in this paper.）

2. Outline of a cDNA microarray experiment

There are "two flows" in the microarray experiment, but they later fuse into "one flow"（See our web site）. The "two flows" are the process of preparing cDNA microarrays and

the process of treating and processing sample RNAs for analysis, i.e. the process of extracting RNAs from a subject organism, purifying them, and labeling them with fluorescence dye. In the former process, most operations differ from those in experiments of the conventional scale, because a large quantity of DNA clones must be used, which requires the use of new devices such as a robot system. On the other hand, the operations in the latter process are not widely different both qualitatively and quantitatively from conventional experiments of molecular biology or molecular genetics.

The products of these "two flows" are both tested in one experimental procedure. That is, microarrays prepared in the first process and targets * (fluorescence-labeled nucleic acids **) prepared in the second process are hybridized.

Then, fluorescent signals on the microarrays are measured with a scanner, recorded as image data that reflect the intensity of the fluorescence, and further converted to numerical data. Eventually, the variations in the transcription level and transcription pattern among the samples are compared using these numerical data.

* In this paper, fluorescence-labeled nucleic acids prepared from sample RNAs are called "targets". In association, cDNAs on microarrays are called "probes". (Some investigators give opposite meanings to these terms.)

** As mentioned later in this paper, "to label a sample RNA (labeling)" generally means "to synthesize a fluorescence-labeled cDNA using a sample RNA and a fluorescent dye by the reverse transcriptase reaction". Of course, a sample RNA includes mRNAs derived from many genes expressed in an analyzed organism so that the cDNA fluorescence-labeled here is a group of cDNAs derived from many genes.

That is to say:

Target

= Fluorescence-labeled cDNAs synthesized from sample RNA to be analyzed

= Group of cDNAs (fluorescence-labeled) from many genes expressed in the organism analyzed (See II.4.)

Ⅱ. cDNA microarray protocols

As mentioned in the introduction, this collection of protocols is made on the basis of the actual procedures of our research group with the operations related to the preparation and use of Rice 9000 cDNA Array in mind. Therefore some modifications and measures may become necessary in applying them to individual cases. We would like the readers to keep this point in mind as they read this paper.

1. Treatment of cDNA for microarray preparation

There are many processes for preparation of the cDNA clone necessary for microarray preparation including the preparation of replicas of *E. coli*, hit pick of independent clones from replicas of *E. coli*, plasmid extraction, PCR, purification of PCR products, electrophoresis, measurement and adjustment of the concentration, and transfer from 96MTP to 384MTP. Although none of them is particularly difficult, a large number of clones must be used, and the quantity of DNA contained in each clone is large, so that various measures to increase the efficiency and precision of the operations are important. Both the manual procedure and the procedure using an automatic system (Rail Robot System "Genesis"; Tecan, Ltd.) are described below.

(1) Preparation of *E. coli* MTP (Micro Titer Plate)

The start samples are more than 40,000 clones of *E. coli* into which rice expression genes have been introduced. (Rice expression genes were cloned in plasmid pBluescript, and a cell line of *E. coli*, NM522, was used for the transformation.)

First, 2 copies each of about 500 independent DWPs * (deep well plates), in which all original clones obtained by RGP (Rice Genome Research Program) were preserved, were prepared using MTPs (Each of about the 500 DWPs was copied to two MTPs to make two sets of about 500 independent MTPs; the two sets are referred to as mother copies and working copies, respectively). Manually, 140 μl each of the medium was infused into each well of MTP using

an electric digital pipette（EP -250/RAININ）, M Tray-1（Stem/PO1MSD）, and a chip for BM-8-1200（BM Instruments/126-96RS）. The medium was 1/2TB（containing 6% glycerol）. After infusion of the medium, the bacteria were seeded using autoclaved 96- unit stamps for replica preparation（MS Machinery）(The stamps were sterilized by autoclaving after each seeding of bacteria and were not reused after sterilization with a flame. That is, for replica preparation, each inde-pendent DWP was copied by using a 96-unit stamp once to make a copy of each indivisual DWP.).

For automatic treatment with “Genesis”, these serial processes were carried out by using a program installed in “Genesis”, “NewProtocol1”.

After copying, the lids were applied to the MTPs without sealing, wrapped twice with polyethylene films, and incubated statically at 37℃ overnight.（The medium is lost due to evaporation when the plates are wrapped inadequately.）

The working copies are used in the next hit picking process. The mother copies are preserved at -80℃ and are set aside as much as possible.

[*(The independent type DWPs were used（845-TPS, QSP Co.）, But this type should be avoided if possible. The use of 2-ml assay block 96 wells（coster/431140）as DWP is recommended. Also, Microtiter plates（Falcon/3072）are used as MTPs.]

(2) Hit picking

In this process, unique clones to be used for the preparation of microarrays（94 MTPs of about 9,000 clones）are selected from the working copies（500 MTPs）incubated overnight, and they are rearranged in MTPs for unique clones（referred to as Destination MTPs）.（See Yamamoto and Sasaki（1997）for the criteria to select the unique clones）. First, by the same method as described above, the medium is infused into the Destination MTPs. Manually, the wells of the unique clones are touched with a sterilized tooth picks, which were then stuck into the Destination MTPs in the right order.

When the automatic system is used, this process is carried out using a program installed in “Genesis”, “Worklist”. The Destination MTPs are incubated stationarily overnight similarly to the method described above.

(3) Plasmid extraction

This is a process to extract plasmid from each clone of the Destination MTPs（namely unique clone MTPs）. In the manual procedure, first, 1 ml each of the medium is poured into DWPs（2 mL Assay Block 96 well（coster/431140））using a serial infuser（Distriman; GILSON）. Then, copies are made from the Destination MTPs incubated overnight to DWPs using 96-unit stamps for preparation of replicas, and the DWPs are sealed with an Airpore Tape Sheet（QIAGEN）and incubated at 37℃ with shaking. After overnight incubation, the DWPs are centrifuged at 3,000 rpm for 30 min（Beckman, Allegera6RK）, the supernatant was removed, and, with the DWPs kept inverted, the remaining medium is absorbed quickly with a Kim Towel. Plasmid extraction was made using a QIAprep96Turbo Mini prep Kit of QIAGEN（See the manual of the kit for details）. The extracted plasmid were recovered with DWPs（easier to handle than the recovery plate contained in QIAGEN's kit）.

With the automatic system, this process is performed using a program installed in “Genesis”, “NewProtocol3”.

The plasmids of each clone extracted here are used as a template for PCR in a subsequent process, but direct PCR from each clone of *E. coli* can also be made without problems. We extract plasmid, because the plasmids of each clone are needed for distribution of clones.

(4) Checking of extracted plasmid by electrophoresis

For electrophoresis, an electrophoresis apparatus for genome analysis of Nihon Eido（processing capacity: 8 MTPs/unit）or an automatic electrophoresis system of Tecan Co. is used. One microliter of plasmid was electrophoresed using a 1% agarose gel/0.5×TBE buffer.

(5) PCR

All plasmids extracted as templates for PCR were diluted 10 times, and PCR was performed under the following conditions.

1）Amplification of the whole length of insert by PCR

Since we use pBluescript as the vector, we amplify the whole length of insert in each plasmid by PCR using M13RV primer and M4 Primer（TAKARA）for 1-2 ng of plasmid template.

The composition of the reaction mixture was as follows:

10×buffer	5 μl
25 mM $MgCl_2$	5 μl
2 mM dNTP mixture	5 μl
20 μM M4 primer	1 μl
20 μM RV primer	1 μl
Plasmid template（1-2 ng; 10-fold dilution of extraction plasmid） （adjusted according to the concentrations and volumes of other reagents）	x μl
Taq polymerase	0.25 μl
Water （adjusted according to the concentrations and volumes of other reagents）	y μl
Total	50 μl

Note: When PCR is performed using a robot system, 1-2 drops of mineral oil is added to the prepared reaction solution.

PCR cycle:

94℃ for 1 min

94℃ for 1 min, 60℃ for 2 min, 72℃ for 2 min（29 cycles）

72℃ for 10 min

2）Amplification of 3'UTR by PCR

Using pairs of upper primer and lower primer designed on the basis of 3' UTRs of the unique EST clones on Rice 9000 cDNA Array（pairs of the gene-specific primers）. These primers were used to amplify the 3'UTRs of the EST clones by PCR. The primer pairs of most of the EST clones have already been prepared for creating an rice EST map by the RGP（Wu *et al*., 2002）. We designed the pairs of the remaining EST clones. The approximate mean amplification size is 250 bp.（UTR: Un-Translated Region）

The composition of the reaction mixture is as follows:

10×buffer	5 μl
25 mM $MgCl_2$	5 μl
2 mM dNTP mixture	5 μl
20 μM Upper primer	1 μl
20 μM Lower primer	1 μl
Plasmid template（1-2 ng） （adjusted according to the concentrations and volumes of other reagents）	x μl
Taq polymerase	0.25 μl
Water （adjusted according to the concentrations and volumes of other reagents）	y μl
Total	50 μl

PCR cycle:

94℃ for 1 min

94℃ for 1 min, 60℃ for 2 min, 72℃ for 2 min（29 cycles）

72℃ for 10 min

（6）Purification of PCR products

After completion of PCR, PCR products are purified by using a QIAquick 96 PCR Purification Kit of QIAGEN（See the manual attached to the kit for details）. The primers are removed, and the PCR buffer was replaced（the PCR buffers contained in the PCR product are considered to inhibit the hybridization reaction if microarrays are prepared without purification of PCR products）.

（7）Confirmation of purified PCR products by electrophoresis

All purified PCR products are electrophoresed using 2.5% agarose gel to examine whether PCR has been successful. The above-mentioned electrophoresis apparatus for genome analysis of Nihon Eido（processing capacity: 8 MTPs/unit）or automatic electrophoresis system of Tecan Co. was used for electrophoresis of these purified DNA samples.

（8）Adjustment of concentration of purified DNA

The concentrations of the purified PCR products are measured by spectrophotometry（measuring wavelength

OD_{260}), and they are concentrated or diluted to 200 fmol/μl. Dilution is made with the elution buffer used for purification, and concentration is made by heating at 60℃. Then, the purified DNA is mixed with reagent D（a DMSO reagent; Amersham Pharmacia）at the following ratio（DNA+water: reagent D = 1:1）.

DNA	48 μl
reagent D	162.5 μl
Water	114.5 μl

（9）Transfer of purified DNA samples from 96MTP to 384 MTP

After the adjustment of the concentration, the purified DNA samples mixed with reagent D are transferred to 384 MTP（GENETYX）, because the array-spotter is designed to be compatible to 384MTP（GENETYX）. This transfer is performed by using a Pipetteman or 96-pin type infusers.

2. Method for using the spotter

Our research group uses Array Spotter Generation III（Amersham Pharmacia）.

Preparation before use:

When the spotter is installed in the clean booth, keep the fan turning to eliminate dust in the clean booth. Also, humidify or dry the spotter to stabilize the humidity（at about 55% R.H.）. Empty the waste discharge bottle of the spotter. Then, supplement MilliQ water, 100% EtOH, and 0.2M KOH to their respective bottles, and MilliQ water to the tank of the humidifier inside the spotter.

Cautions:

＊**Avoid drying of the tip of the pen set for the spotter.**

Twelve minute capillary pens are arranged linearly on each pen set.

Drying of the tips of the pens increases the possibility of clogging.

＊**Do not use glass slides with slanted bar-code seals or those with damages for spotting.**

（1）Open the stopper of the nitrogen tank connected to the spotter. Then supply nitrogen to the spotter by opening the white valve on the side of the body of the spotter.（Open the stopper of the tank until the NITROGEN meter on the side of the body of the spotter indicates 9 psi.）（This compressed nitrogen is used for the drying of the spotting pins in washing them.）

（2）Turn on the switch of the vacuum pump and wait until the VACUUM meter on the side of the body of the spotter indicates -25 Hg.（This negative pressure fixes and holds the glass slide on the Slide Tray［see below］during spotting.）

（3）Initialize the spotter booting the software “Genration III Array Spotter Control” installed in the computer connected to the spotter.（Do not touch the mouse or the keyboard during initialization, because it may put the arm or other parts of the spotter out of control and cause damages to them.）

（4）When the menu screen appears, turn the “Humidity Control” button on and adjust the humidity inside the spotter at an appropriate level（about 55% R.H.）.

（5）Click “Road Slides/Plates” in the left of the screen to show a small window. In this state, the door of the spotter can be opened or closed.（Usually, the door does not open when the spotter is in action.）

（6）Attach the pen set to the arm of the spotter and fix it tightly with accompanying screws. Also, exchange the MilliQ water in the Park Station for pen set, which is located to the left of the Slide Tray about once a week.（The tips of the pen set attached to the arm are kept in the water in the Park Station when the spotter are stationary after booting.）

（7）Put glass slides serially from the farthest left to the right of the Slide Tray.（The Slide Tray has 36 glass slide units（4 columns×9 rows）.）Remove the dust on the glass slides with compressed air by using an air duster or other instruments, hold the glass slides with the bar-code side turned to the operator, and set them by fitting one corner of each glass slide to the far left corner of each unit.（When the number of glass slides for spotting is

not a multiple of 9, increase the number of glass slides to a multiple of 9 by adding dummy glass slides. If the number of glass slides is not adjusted to a multiple of 9, the slides cannot be fixed during spotting, causing unevenness of the spotting volume or the spot intervals, since the vacuum apparatus operates to each row (= 9 slide units).)

(8) Insert 384-well plates (containing DNA for probe), which have been spun down in advance, into the Microplate Elevator on the left side of the interior of the spotter serially from bottom up in a manner that Plate A1 is placed in the far right corner (with the bar-codes of the plates turned to the back of the spotter). After all the plates have been inserted, close the door of the Microplate Elevator, then close the door of the spotter tightly.

(9) Click the "Ready" button in the small window on the same screen as (4) and (5).

(10) Wash the pen set by clicking the "Manual Wash" button in the right of the same screen. Repeat this washing 10 times.

(11) Select "Spotting Parameters" from "Options" of the menu on the same screen and set the Spot Diameter at 250 μm and the Spot Buffer at 30 μm. Then, select "Spotter Set Up" from "Options" and set the Plate Number at 12, Slide Number at 36, Well Sets at 32, and Spot/Dip at 72.

(12) Start the spotter by clicking the Start button in the left the screen. If there is an error in this process such as that the door of the Microplate Elevator is open, a small window (with an error message) appears on the screen. After correction of the error, the spotter can be restarted by clicking "Start" in the small window. Spotting of twelve 384-well plates to 36 glass slides (the maximum processing capacity on 1 run) can be completed in about 4 hours. [Note]

(13) After spotting has ended, wash the pen set by clicking "Manual Wash" in the right of the screen. Repeat this washing 10 times. Then, click "Road Slides/Plates" in the left of the screen, and, after a small window appears, open the door. Put the pen set and 384-well plates back, close the door, and allow the spots on the glass slides to dry by allowing them to stand in this state for about 4 hour.

(14) After the spots have dried, place the glass slides in a lightproof glass slide case and store them with a desiccant in a desiccator (or under dry condition).

(15) Finish "Generation III Array Spotter Control", close the white valve and the stopper of the nitrogen tank on the side of the body of the spotter, and turn off the switch of the vacuum pump.

[Note] Distribution of spots on glass slides:

The maximum number of spots obtained with this spotter (12 pens) is 4,608 spots × 2 repetitions = 9,216 spots per slide. In this case, the spotting pattern of (12 pens) × (2 spottings of the same clone with one pen) is repeated 384 times on 1 slide.

As a result, the spots are distributed on one glass slide as follows: Twenty-four fields are arranged in 12 rows × 2 columns; 384 spots are arranged in 12 rows × 32 columns in each field (24 × 384 = 9,216 clones). In Rice 9000 cDNA Array, which we prepare, cDNAs are spotted on the nearly entire surfaces of two pieces of glass slide.

3. Preparation of RNA for microarray experiments

There is no particular method for the preparation of RNA suitable for microarray experiments. Although we have not performed exact comparisons, we consider that there is no difference in the results of experiments according to the dif-ference among extraction methods such as the CTAB method, guanidine method, and SDS/phenol method. What is important is that the RNA is purified "to an extent", i.e. the extracted RNA contains no residual impurities or contaminants such as proteins, polysaccharides, and reagents. That means that reverse transcription should be performed by using the isolated RNA. Even when the results of spectrophotometry (values of $O.D._{260}/O.D._{280}$ or $O.D._{260}/O.D._{230}$) of the extracted samples may be satisfactory, it is recommended to confirm the presence and the quality of RNA by electrophoresis (or using the LabChip system of Agilent

Technologies/Caliper Technologies）. The use of commercial RNA extraction kits（e.g. QIAGEN RNeasy Kit）is also recommended for the extraction and purification.

Either total RNA or mRNA can be used for microarray experiments（See Section 4 below）. Generally, mRNA gives you higher intensity of inflorescent signal than total RNA.

4. Target preparation

（1）One color fluorescent method

Here, a protocol for 1 set of Rice 9000 cDNA Array（two pieces of slide）is described.

Preparation before the beginning of experiment:
Set the temperatures of heat blocks（37°C, 42°C, 70°C, and 95°C）. Set an oven for hybridization at 60°C and put it in a suffi-ciently-humidified state.

Caution: Dissolve frozen reagents on ice.

1）Prepare the reaction fluid by mixing mRNA, or total RNA, with the reagents below in a 1.5-ml tube and spin it down.

mRNA（+dH_2O*）	10 μl（contains 2 μg）	
Total RNA（+dH_2O*）		12 μl（contains 40 μg）
Control RNA	10 μl	10 μl
Oligo-$(dT)_{25}$	2 μl	2 μl
Random Nonamer Primer	2 μl	
Total	24 μl	24 μl

（*Adjust the volume to the values as prescribed above by adding dH_2O or concentrating RNA solution, depending on the RNA concentration so that the quantities of RNA become those shown in the parentheses above.）

2）Perform pre-annealing at 70°C for 5 min.

3）Incubate the fluid at 25°C（room temperature）for 10 min and spin it down.

4）Add the following reagents to the tube of 3）, pipette the mixture gently, and spin it down.

5×Super Script buffer	8 μl
0.1 M DTT	4 μl
dNTP mix	2 μl
Cy5-dCTP*（or Cy3-dCTP）	2 μl
Super Script II**	2 μl
Total	18 μl

* Important: Avoid exposure to light after the addition of Cy-dye.

** Important: Add Super Script II last.

5）Allow the mixture to react at 42°C in the dark for 2.5 hours.

6）Heat the mixture at 94°C in the dark for 3 min and spin it down.

7）Add 4 μl of 2.5 M NaOH and mix.

8）Allow the mixture to react at 37°C in the dark for 15 min.

9）Add 20 μl of 2 M HEPES, gently pipette the mixture, and spin it down.

10）Purify the synthesized target by using the QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）or the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit（Amersham Pharmacia）. Then, dry it up with a vacuum concentrator.
（At this time, protect the vacuum concentrator from light, and keep its interior dark.）

11）Add 12 μl of dH_2O to the tube of 10）and thoroughly dissolve it. Then, spin down the mixture.

12）Heat it at 95°C in the dark for 4 min.

13）Cool it rapidly on ice in the dark for 30 seconds, and spin it down（at 4°C）.

14）Add 3 μl of Oligo A80（1 mg/ml）, pipette the mixture, and spin it down.

15）Allow the mixture to react at 70°C in the dark for 45 min, and spin it down.

16）Add 45 μl of slightly warmed ExpressHyb buffer（Clon-tech）, mix the content gently by pipetting without making bubbles, and spin down the mixture.
The final volume of the content is 60 μl.

（2）Two-color fluorescent method

Here, the protocol for 1 set of Rice 9000 cDNA Array（two pieces of slide glass）is described.

Preparation before the beginning of experiment:
Set the temperatures of heat block（37℃, 42℃, 70℃ and 95 ℃）.
Set an oven for hybridization at 60℃ and put it in a sufficiently-humidified state.

Caution: Dissolve frozen reagents on ice. Prepare tubes for Cy3 and Cy5, and perform the respective procedures below using them.

1）Prepare a reaction fluid in a 1.5-ml tube by mixing the following reagents and spin it down.
（Use either mRNA or total RNA.）

mRNA（+dH_2O*）	10 μl（contains 2 μg）	
Total RNA（+dH_2O*）		12 μl（contains 40 μg）
Control RNA	10 μl	10 μl
Oligo-$(dT)_{25}$	2 μl	2 μl
Random Nonamer Primer	2 μl	
Total	24 μl	24 μl

（* Adjust the volume to the values as prescribed above by adding dH_2O or concentrating RNA solution, depending on the RNA concentration so that the quantities of RNA become those shown in the parentheses above.）

2）Perform pre-annealing at 70℃ for 5 min.
3）Incubate the fluid at 25℃（room temperature）for 10 min and spin it down.
4）Add the following reagents to 3）, pipette the mixture gently, and spin it down.

5×Super Script buffer	8 μl
0.1 M DTT	4 μl
dNTP mix	2 μl
Cy3-dCTP*（or Cy5-dCTP）	2 μl
Super Script II**	2 μl
Total	18 μl

* Avoid exposure to light after the addition of Cy-dye.

** Add Super Script II last.

5）Allow the mixture to react at 42℃ in the dark for 2.5 hours.
6）Heat the mixture at 94℃ in the dark for 3 min and spin it down.
7）Add 4 μl of 2.5 M NaOH and mix.
8）Allow the mixture to react at 37℃ in the dark for 15 min.
9）Add 20 μl of 2 M HEPES, gently pipette the mixture, and spin it down.
10）Purify the synthesized target by using the QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）.
11）Pool the samples of Cy3 and Cy5 purified and eluted in the previous sentence 10）in one tube. Then, dry it up in a vacuum concentrator.（At this time, protect the vacuum concentrator from light and keep it in the dark.）
12）Add 9 μl of dH_2O to 11）and thoroughly dissolve it. Then, spin down the mixture.
13）Heat the mixture at 95℃ in the dark for 4 min.
14）Rapidly cool the mixture on ice in the dark for 30 seconds, and spin it down.
15）Add 6 μl of Oligo A80（1 mg/ml）, pipette the mixture, and spin it down.
16）Allow the mixture to react at 70℃ in the dark for 45 min, and spin it down.
17）Add 45 μl of slightly warmed ExpressHyb buffer（Clontech）, mix the content gently by pipetting without making bubbles, and spin down the mixture.
The final volume of the content is 60 μl.

5. Hybridization

Preparation before experiment:
Perform UV cross-linking of microarrays（50,000 μJ/cm^2）before hybridiation.（Whether performing UV cross-linking or not is reported to have little effect on the experimental results.）Use cross-linked microarrays as soon as possible and do not store them long. Confirm being set an oven for hybridization at 60℃ and being put it in a sufficiently-humidified state.

（1）Remove dust from the surfaces of glass slides and cover glass with compressed air（air duster）. Drip half the final volume mentioned in the sections 4.（1）16）and 4.（2）16）on an end of the first glass slide and apply the cover glass gradually from this end.

（Usually drip 30 μl from 60μl of the final volume onto glass slide.）

(Cautions: Pay sufficient attention not to let bubbles in. Also, do not move the cover glass once applied.)

（2）Drip the remaining half volume on the second glass slide and similarly apply the cover glass.

（3）Place Kimtowel（a kind of paper towel）or sponge in a sealable container such as Tupperware and Tight Box（TECH-JAM）and let it sufficiently absorb water warmed to about 60℃. Place a mount above it and put the glass slides with the cover glass on.

Tightly apply the lid of the container and seal it.

（4）Perform hybridization for 4 hours at 60℃ in the dark in an oven for hybridization in a sufficiently-humidified state.

6. Washing of glass slides

Preparation before washing:

Warm two washing buffers（1×SSC, 0.2% SDS and 0.1×SSC, 0.2% SDS）to 55℃ in advance.

Set an oven for hybridization at 55℃.

（1）Place a sufficient volume of 1×SSC, 0.2% SDS warmed to 55℃ in a black wash box（= a light-proof box with a lid for washing equipped with a rack for glass slides）.

（2）Place 1×SSC, 0.2% SDS warmed to 55℃ into a wide-mouthed container such as Tupperware（ca. 15cm×ca. 20cm）. Immerse the glass slides in this buffer and remove the cover glass and quickly insert them into the rack in the wash box described in（1）. At this time, place the glass slides at even intervals as much as possible in the rack. Apply the lid, and allow the washing buffer to shake gently at 55℃ in the dark for 10 minutes.

（3）Place 0.1×SSC, 0.2% SDS warmed to 55℃ into another wash box, quickly transfer the rack described in（2）into it, apply the lid, and allow the wash buffer to shake gently at 55℃ in the dark for 10 minutes.

（4）Place 0.1×SSC, 0.2% SDS warmed to 55℃ into another wash box, quickly transfer the rack described in（3）into it, apply the lid, and allow the wash buffer to shake gently at 55℃ in the dark for 10 minutes.

（5）Place 0.1×SSC at room temperature into another wash box, quickly transfer the rack described in（4）into it, and wash the glass slides by moving the rack up and down about 10 times in the buffer.

（6）Place 0.1×SSC at room temperature into another wash box, quickly transfer the rack described in（5）into it, and wash the glass slides by moving the rack up and down about 10 times in the buffer.

（7）Place MilliQ water at room temperature into another wash box, quickly transfer the rack described in（6）into it, and wash the glass slides by moving the rack up and down about 5 times in the water.

（8）Remove the water on the glass slides being held in the rack by centrifuging in a centrifuge for plates adjusted to room temperature at 900-1,000 rpm for 4 minutes. Perform the scanning thereafter.

7. Scanning

（1）Scanning by Array Scanner Generation Ⅲ

Cartridges for slide glass and a magazine for setting the cartridge are attached to this scanner（Molecular Dynamics manufactured by Amersham Pharmacia）（refer to the photographs on the Web site of http://microarrays.ucsd.edu/resources/gen3scanner.php）. Scan glass slide using these devices.

1）Turn the scanner and then the computer on to start them up.

2）Start up software “Array Scanner Control” to initialize the scanner.

3）Take the magazine out of the scanner after the initialization has ended.

4）Remove dust on a glass slide using an air-duster.

5) Keep a slide cartridge with a hand with the Q-shape notch towards you with the slide stopper to the left. As pressing the spring just in front of the stopper, set the glass slides at the fixed position. Here, keep the spot surface upwards, and keep the barcode to the opposite side of the Q-shape notch.

6) Insert the cartridge into the magazine with the spot surface upwards (It is desirable to insert cartridges from the bottom stage of the magazine in the order of sample numbers because scanning begins with the bottom stage of the magazine).

7) i) Scanning in the manual mode

Set the "Scanner Mode" to 'Manual' in the initial screen of "Array Scanner Control." Select "Scan Setup" in the "File" menu. In this screen, select "Full Slide" from "Slide Area," and then set "Scan Parameters" (the wavelength to be used, the scope to be scanned, choice of the glass slides to be scanned, and so on). Clicking the "Done" button brings you to the initial screen. Click the "start" button. As the saving window is displayed, enter a file name with which you save image data and click the "OK" button. Scanning will start.

ii) Scanning in the automatic mode

Set the "Scanner Mode" to 'Auto' in the initial screen of "Array Scanner Control." When the start button is clicked as it is, scanning begins. In this case, the spots on the whole glass are automatically scanned by two wavelengths (for two colors of Cy5 and Cy3). Image data are also automatically saved in a file with the name of the barcode number. In case the barcode cannot be read, the file is named as "Slide xx" (meaning the slide scanned as the xx-th piece).

8) Image data taken by the one-dye method are saved in two folders (each folder contains two files) and two files with no folder. First of all, this section mentions the two folders of xxx.dir and xxxb.dir. Folder xxx.dir contains the two files of xxx.ds and xxx_L_1.GEL. On the other hand, folder xxxb.dir contains the two files of xxxb.ds and xxx_R_1.GEL. This is because a piece of slide glass is scanned on the left side and on the right side separately. xxx_L_1.GEL corresponds to the image of the left side, and xxx_R_1.GEL to the image of the right side.

The two files with no folder are xxx.ds and xxxb.ds. These are quite the same files as those with the same names in the folders.

(For reference: When image data taken by the two-dye method are scanned, the data are scanned in the order of Cy3 and then Cy5 in the automatic mode, so the image of Cy3 is saved in xxx_L_1.GEL and the image of Cy5 in xxx_L_2.GEL. The data are scanned in the order of Cy5 and then Cy3 in the manual mode, so the image of Cy5 is saved in xxx_L_1.GEL and the image of Cy3 in xxx_L_2.GEL.

If using software "Image Quant," you can view an image of the left side in xxx.ds and an image of the right side in xxxb.ds. Either image is viewed in two colors overlapped each other.)

9) After the scan has been completed, exit "Array Scanner Control" and turn the scanner off.

(2) Scanning by FLA-8000

Using FLA-8000 (a scanner manufactured by Fuji Film) makes it easier to set slide glass than using Array Scanner. Simply insert some pieces of slide glass into the slide carrier (that can set up to five pieces of slide glass) and set the slide carrier on the main unit.

1) Turn the scanner and then the computer on to start them up.

2) Start up software "Image Reader FLA-8000 v1.12" to warm up the scanner.

3) Take the carrier for slide glass out of the scanner, and put the carrier on the handle side.

4) Remove dust on the slide glass using an air-duster. To set a piece of slide glass on the carrier, grasp the end of the barcode side with the spot surface upwards and insert the piece into the carrier. Next, set the carrier inside the scanner properly and close the covering of the scanner.

5) Set "Scan Conditions" (namely set "Resolution" to '10 μm'; "Scan Mode" to 'High sens.') and "Area" (push "Max" button on to set the maximum area). Select wave-

length of “laser” and the number of pieces of slide glass to perform scanning.（You can perform “pre-scan” to confirm the quality of the array image beforehand.）Click the “Scan” button and start scanning. After the scan has been completed, click the “Save” button to save image data.

6）For each image to be saved, a file and a folder are created together as a pair. This file contains backup information（or setup information）, and the file name is “the folder name of the pair .set”. On the other hand, the folder contains the three files of xxx-x.img, xxx-x.inf, and Info.set. The “-x” of xxx-x.img and so on indicates the wavelength of the laser used for the scan. For example, when the sample has been scanned using the wavelength of Cy5, the file name is xxx-635.img and so on.

（For reference: By using “Convert to TIFF” of the “File” pull-down menu of “Image Reader MAS-0,” which is an old version of “Image Reder,” an img file can be converted into a tif file.）

7）After the scan has been completed, exit “Image Reader FLA-8000” and turn the scanner off.

8. Quantification of Image Data

This section describes the usage of the three types of quantification software that have been used by our group. A detailed operation guidebook in Japanese and an operation manual in Japanese（including detailed operation methods）are attached to the software of section（1）. The software of section（2）and the other software of section（3）provide only an operation manual in English, so no manual in Japanese has been prepared（as of the end of year 2000）.

［The definition of the terms used in this chapter.

Template: A frame determining an area for measuring and quantifying the intensity of fluorescent signal.

Gene Information File: A file containing the numbering of clones on a Microarray, clone ID, accession No. and so on.］

（1）ArrayGauge v.1.31（for Windows; analysis software produced by Fuji Film）

To quantify the data obtained by the Rice 9000 cDNA Array（manufactured by STAFF Laboratory）, install the template for the Rice 9000 Array and the Gene Information File related to the spot on the array in advance.（For the details of the installation, contact Fuji Film’s person responsible for Array Gauge.）

If creating a new template individually, refer to the operation guidebook and operation manual of this software（both of them written in Japanese）because the detailed operation procedure is described in them.

1） Start up ArrayGauge. The items of the analysis procedure are displayed in the upper portion of the screen as a flow chart. Go on the analysis according to this order.

The item currently analyzed and the next item（the lowest button of the left panel）are also displayed in the left panel of the screen.

（a）For img file: Click the “Image” icon button in the upper portion of the screen. Next, click the “Trimming” button in the left panel of the screen. A small window appears. Select an img file and click “Open” button to open the file. Then, the “Trimming” window will be displayed. While dragging the green perpendicular at the right end of the gradation adjusting graph（“Range Scope”）in the lower portion of this small window, adjust the shade and the color tone of the image.

（Note: Even if the gradation or shade of the image is changed here, the original fluorescent intensity is not changed. Therefore the final measurement results are not influenced.）→ Go to the “Display” icon button.

（b）For tif file: Click the “Image” icon in the upper portion of the screen. Next, click the “Trimming” button in the left panel of the screen. Select a tif file and click “Open” button to open the file. As a small window will be opened, adjust “Range Scope” in this window and save the file as another name. → Go to the Display icon button.

2）Click the “Display” icon at the lowest portion of the left panel of the screen, or the “Display” icon in the upper portion of the screen. Confirm that “Scale” has been “exponential” in the left panel. To perform a fine adjustment for the array image, while dragging the green perpendic-

ular of the gradation adjusting graph in the lower portion of the left panel of the screen, adjust the shade and color tone of the image.

（Note: Even if the gradation or shade of the image is changed here, the original fluorescent intensity is not changed. Therefore, the final measurement results are not influenced.）

When you have selected an image file that has not been analyzed yet from the folder icon, click the "Range Scope" button of the left panel to display the "Trimming" window, and adjust gradation using the method mentioned at step 2). → Go to the Measure icon button.

3) Click the "Measure" icon in the lower portion of the left panel of the screen, or the "Measure" icon in the upper portion of the screen. If you select a template for the Rice 9000 Array using the "Select" button in the left panel and click the "OK" button, the selected template is displayed on the array image. Be careful about the correspondence of the image data and the template.

（For example, if a template for the second slide glass is used for the image data of the first slide glass, it is not possible to attach cDNA information for the first slide glass to the text data to which quantification has been completed afterwards. Be careful with this case because a template is to be attached again and you should perform the procedure from step 3) again.）

4) To move the template and align it roughly with the position of the spot, use the leftmost two buttons of the three square "Fitting" buttons horizontally arranged in the left panel and the hand button in the upper portion in the left panel. Click the "Auto Option." Then, a small window ("AutoFitting Parameters Option") will be displayed. In the window, set the "Block Alignment Type" to 'independent' and the "Spot Alignment Sensitivity" to '4' (or '3'). Select the "Spot Appearance" according to the state of spotting, set the "Centering Prameter" to '3' (or '4') and click "Auto". By this operation, the template is adjusted so that it is automatically fit to the spot. Manually correct the location where the template is not fit to the spot, (repeat Auto Option again in certain circumstances), finally fit the template to all of the spots completely.

(Option 1: Set the positive control spot at this stage. Use the "Choice" button in the left panel to select spots for positive control. Next, click the "Attribute" button to change the attribute of the spots to 'Control'. The color of the template of positive control spot will change into green; Option 2: Use the "Background" button in the left panel at this stage to set the area for global background. Refer to step 10)).

→ Go to the Analysis icon button.

5) Click the "Analysis" icon in the lower portion of the left panel of the screen or the "Analysis" icon in the upper portion of the screen. When an image file is analyzed, three windows (in short, in addition to the array image already opened at step 5), a table of measurement results for spot fluorescent intensity and a pattern image indicating the distribution of concentration for each spot) appear on the screen. When two image files are analyzed, seven windows (in short, two array images, two pattern images corresponding to the respective images, a measurement results table of spot fluorescent intensity, a "Compare" window in which the pattern images are compared, and a scattering plot in which two sets of measurement results are compared) appear on the screen. The spot and data on each window are mutually liked. (There is no link, however, in the directions from each point of the scattering plot to other windows.)

6) To add the cDNA information on the array to the table of measurement results, first of all, make the window of the table of measurement results active and click the "cDNA info." button in the left panel. A small window ("cDNA Info") will be displayed. Click the "select" button in the small window. Select the file corresponding to the table of measurement results (for example, select the file "Rice9000FullArray1-stInfo" for the results of the 'first slide' of a pair of Rice 9000 Array [a 'first slide' and a 'second slide'] from the Gene Information Files installed in advance, and click the "OK" button.

The items contained in the Gene Information File are displayed on the left side of the small window. First,

select only the “Element No.” in the window, and click the “Add” button to move the “Element No.” to “Index Matching Information”. Next, click the “Add all” button to move the remaining gene information to the “Gene Information to Display” box. Finally, click the “OK” button. The gene information corresponding to each spot in the table of measurement results will be displayed.

7）Click the “Measure Option” button in the left panel. A small window（“Measure Option”）will be displayed. Background or normalization can be set from this window（Background can be also set using “Range Option”. Refer to step 10））.

（Note: Global normalization is often performed as normalization. Normalization cannot be performed successfully in many cases using positive control.）

8）Make the table of measurement results active and click the “Table Option” button in the left panel. A small window（“Table Option”）will be displayed. In this window, measurement results and clone information can be arrayed again in the order of ‘No.’ or ‘Index’（only ascending order available for both the items）, ‘Dens.’（in the descending order of measured values）, or ‘Ratio’. For ‘Ratio’, data ratio between a sample and another sample can be displayed in descending order（by clicking the “Ratio（down）” button）or in ascending order（by clicking the “Ratio（up）” button）. Moreover, by selecting the “All” button from “List Amount” in this window, the data and information of all clones can be displayed in descending order from the maximum data. On the other hand, by selecting the “Top” button and then entering the number of the sets of data you want to display, data and information corresponding to this number can be displayed in descending order from the maximum data. When the “Selections” menu is selected from “List Choice” in this window, only the clones that ‘OK’ has been entered in the “Status” box of the results table are listed.（To enter ‘OK’, simply click the “Status” box of each clone.）

9）Make the array image active and click the “Range Option” button in the left panel.

The cursor changes into a cross, so click any spot on the image with the cursor. A small window（“Range Option”）will be displayed. In this window, the background area and measurement concentration area can be adjusted. Our group uses the settings mentioned as（a）below to perform analysis.

（a）Select “OutLine” from the “Display” mode, and leave the blank boxes of “Limit Density Range” as they are（without entering a check mark）. Click the blank field of “Peak Noise Reduction” to enter a check mark.（Leave the setting of the “Limit Density Range” 0%）. Select the “Local” button on the “BackGround”, and set “BG Thickness” to ‘3’ and “BG Space” to ‘0’. Click “OK” button.

（Note: To select “Global BackGround” here, it is necessary to set a background area at step 5）.）

→Go to the “Annotation” icon or the “Save” icon.（In this latter case, skip step 10）and go to step 11）.）

（b）［Option］Change the “Display” mode into “OutLine”, and click the blank boxes of “Limit Density Range” and “Peak Noise Reduction” to enter check marks.（Leave the setting of “Limit Density Range”0%）. Select the “Local” button on the “BackGround”, and set “BG Thickness” to ‘3’ and “BG Space” to ‘0’. Click “OK” button.

（Note: To select “Global BackGround” here, it is necessary to set a background area at step 5）.）

→ Go to the “Annotation” icon or the “Save” icon.（In this latter case, skip step 10）and go to step 11）.）

10）Click the “Annotation” icon in the lower portion of the left panel of the screen or the “Annotation” icon in the upper portion of the screen. By selecting the “A” icon in the left panel, characters can be entered on the array image. By selecting the “arrow” icon, an arrow can be entered. → Go to the “Save” icon.

11）Click the “Save” icon in the lower portion of the left panel or the “Save” icon in the upper portion of the screen. Here, make the table of measurement results active, and click “Export” to save the table in the text format. To save the array image as an img file, make the array image active and click “Save”（You can save the array image as a tif file or a bmp file by selecting “Export”）.

（2）MicroArray Suite（for Mac; analysis software produced by M&S Instrument）

This software can analyze the data of the tif file format.

Preparation: Create a gene information file for each spot（See 4）(b) described below）.

1）Work before quantification: In some cases, a fluorescent image of microarray experiment includes an area（or areas）with extremely high fluorescent intensity unnecessary for analysis in a portion such as a high area of the background（many of such an area are found around the outer edge of the slide glass）or the barcode portion. Hence, for using MicroArray Suite, cut a spot signal area out of the array image to create a new file.（Quantification will be difficult unless this work is performed.）

a）Start up MASbata21, and select the tif file of an image you want to analyze to open it from the “File” menu. Select “Normalization” from the “Enhance” pull-down menu to adjust contrast. Select the loupe icon in the “ROI” window（the image is expanded by clicking it and reduced by clicking it with pressing and holding the “Option” key）, and adjust the image size so that the whole slide glass can be viewed. Next, click the “Cut” icon and enclose the portion of the image you want to cut out. By selecting “Crop image” from the “Edit” menu, only the portion of the image you want to cut out is displayed.

b）To minimize the value of dust or dirt on the glass, select “Median Filter” from the “Enhance” menu, and apply the filter twice using 3×3 pixels. Be careful about applying the filter many times because this influences the measured values of fluorescent intensity of the spots.

c）Select “Save As ” from the “File” menu, and save this ‘cut-out’ image as another file name. This image is used for quantification nalysis afterwards. Although this image file is also in the tif format, the shape of the icon is different from that of the tif file of the original image.（Note: If this ‘cut-out’ image is saved using the same file name that the original image has, the original image is lost.）

（For reference: When this ‘cut-out’ image is saved, if an extender of .tif is attached after the file name, the image can be opened even in the Windows environment.）

d）Exit MASbata21.（After this, start up this software again to perform quantification.）

2）［Quantification starts from here.］Start up MASbata21 again, and select the tif image file saved at step 1）to open it. Select “Normalization” from the “Enhance” menu and adjust contrast. Select “invert” from the “Enhance” menu, check the “invert CLUT,” and click “OK”. This operation allows the signal to be displayed in black and the background in white.（If you perform the same operation again, the colors of the image are inverted.）

3）Select “Place Grids” from the “Ext.” menu. The grid last used at the previous time and a small window（“Grid Set-up”）will be displayed.

4）To create a new grid, follow the procedure below.

(a) When “New” is selected in the small window, another smaller window（“Confirm Save”）is displayed. In the window, select “No” and click “Clear Grids” in the lower portion of the array image. The grid displayed so far will disappear on the screen.

(b) Select and set up the gene file you want to use from “Load Gene Library” in the “Grid Setup” window. Next, set up four respective items（“Super Grid Rows”, “Super Grid Columns”, “Sub Grid Rows”, and “Sub Grid Columns”）according to the pattern of spotting.

［Example: If DNAs have been spotted to the whole surface of a piece of slide glass like the Rice 9000 Array, set “Super Grid Rows” to ‘12’（the number of field rows）, “Super Grid Columns” to ‘2’（the number of field columns）, “Sub Grid Rows” to ‘12’（the number of rows of spots in a field）, and “Sub Grid Columns” to ‘32’（the number of columns of spots in a field）. For spotting pattern or field of the Rice 9000 Array, refer to the note at the end of “II. 2. Spotter Usage” in this protocol.］

When the cursor is drugged from the top left spot to

enclose a field of the array image , the grids for the remaining fields are also displayed.

5）Fit grids to spots one by one. All grids are linked each other. So, when a grid of the left side is moved, the grids of the right side are also moved together. When a grid of the upper side is moved, the grids of the lower side are also moved together. Hence, fit grids to spots in the order of left grid to right grid and upper grid to lower grid. To remove the link between a grid and another grid, first move the cursor to the field you want to remove the link, and click the field with pressing the apple mark. Only the grid will be changed into blue, and the link can be removed.（Here, the shape of the cursor changes into a shape like a chain）. To restore the link, perform the same operation.

In addition, the "Grid Cell Mode" button is pre-pared in the lower portion of the image window. In this mode, all the cells enclosing the spots of the same positions in respective fields are linked each other. So, if a cell is moved, all the other cells are moved the same way. To remove the link, perform the same operation as that mentioned above.

After you have removed the link of a grid, be sure to restore the link.

When you want to change the size of a field, align the cursor with the outer frame of the field. The cursor will change into an arrow, so drag the arrow to adjust the size of it.

Be sure to save the created grid as a name. After grids have been fitted to spots, click "OK" on the right side of the lower portion of the image window.

6）Select "Process Arrays" from the "Ext." menu and check the contents of the items in "Place Grid Setting". Set "Target Size" in "Processing Specifics" to '10 pixels', "Type" to 'Thresholding', "Weight" to '3', "Background Subtraction" to 'Local', and "Intensity Average Within" to 'Target'. Moreover, confirm that "Target Analysis" has been set as 'Target Detection Only', and press "OK".（Here, be sure to confirm that no Japanese FEP is active. Note that if Kotoeri or ATOK is still active, this software may be forcedly shut down.）Then, three windows（the originally displayed image, a window where an image file called "Processing Result" is overlaid on a grid, and a table of measurement results called "Sample Intensities"）will appear.

7）When the "Display Array Data" mode is selected from the "Ext." menu, two windows（"Color Image" and "Sample Intensities"）are opened. In the "Color Image" window, key codes correspond to the keyboard（For example, when 'H' is pressed, the help of the key codes are displayed.）Up to 100 sets of data of clicked spots are displayed in "Clone Info", so only the data of interesting spots can be picked out. By pressing 'Q' or double-clicking, you can exit from the "Display Array Data" mode. Unless you exit the "Display Array Data" mode, other work（for example, save a file）cannot be performed. Moreover, note that once you exit the "Display Array Data" mode, you cannot enter the mode again.

8）To save necessary data using "Save As", apply names different each other to all files you want to save. All files are saved in the format dedicated to MicroArray Suite.（The "cut-off image", a tif image file, created at step 1）is left as a tif file. Refer to 1）d））. "Sample Intensities" can be saved in the text format（with tabs）. So, when "Sample Intensities" is saved as using "Save As", if a txt extender is attached, the file can be also opened in the Windows environment. Open and analyze this text file with table calculation software such as Microsoft Excel.

9）As mentioned above, software MicroArray Suite introduced in this section creates many windows from a microarray image file. Accordingly, during work it is safer to analyze the image while saving each window as a file one by one.（For example, when you want to exit this software and select "Dispose all windows" from the "Window" pull-down menu, all the windows open there are closed. In short, any window in which data have not been saved yet is also closed.）

（3）ArrayVision（for Windows; analysis software produced by Molecular Dynamics）

1）Start up “ArrayVision.” When the rightmost icon displayed in the upper portion of the window（the “Array Macro” button）is clicked, two small windows appear. One is the “Run: [ArrayMacro]” window, which is shown on the right side of the screen（Here “[Display Format]: Change display format” is displayed. In this window, each stage of the procedure for quantification is displayed.）The other is the “Run[Display Format]” window, which is shown at the center of the screen. Set “Image type” to ‘16 bits’（default）, “total # of channels” to ‘4’（default）, “total # of views” to ‘1’（default）, and click “OK”.

2）In the “Run: [ArrayMacro]” window, “[ARV Analysis setting]: ArrayVision channels and measure selection” is displayed（“Run[Display Format]” has disappeared）. The “Run Macro” window appears at the center of the screen when the Set “Analysis type” to ‘Expression’, “Arrays and Channels” in “Arrays/Templates” to ‘single array’, “Template mode” to ‘single’, “Element value” in “Quantification” to ‘Dens x Area’, “Background” to ‘average’ and check all the check boxes in ““Measure selections”. Then, click “OK”.

3）In the “Run: [ArrayMacro]” window, “[Loading Image Set]: Load multiple images from files.” is displayed（“[ARV Analysis setting]: Array Vision（the following is omitted）” has disappeared）. The “Retrieve image set” window appears at the center of the screen. Select the GEL file you want to analyze from the files displayed in the left box of this window and press the “Add” button to display the file in the right column（“images to load”）. Click the “OK” button.

4）A small window called “Loading Image”（displaying that the file is being loaded）appears. When the small window has disappeared, the “Image view” window appears. In this window, the GEL file（= an array image）you selected above is displayed. In the “Run: [Array Macro]” window, the sentence of “[Pause]: Cause macro execution（the following is omitted）” and the “Stop” icon are displayed（“[Loading Image Set]: Load multiple（the following is omitted）” has disappeared）. The “Visuals” window is also displayed behind these windows.

5）Click the third icon, “Histogram”, in the upper left portion of the “Visuals” window（hidden behind the “Run: [ArrayMacro]” window）. A histogram indicating the pixel distribution of fluorescent signal is displayed in the right half of the “Visuals” window（= the LUT map）. Adjust the image to the most appropriate contrast, while moving the diagonal line（in brown）, which is drawn from the bottom left corner to the top right corner of the LUT map, in the direction of the X axis by drugging both the ends of the line, and viewing the image in the “Image view” window.（Appropriately adjust the magnification of the image in the “Image view” window by selecting “magnification” from the pull-down menu of the icon, which is colored green and red, at the top left corner of the “Image view” window.）

6）Click the “Resume” button（in green, blinking）below the “Stop” icon in the “Run: [ArrayMacro]” window. The “Template Definition [Untitled]” window will newly appear at the center of the screen. Create a template in this window.（The template is a frame applied to the spot on the array image to measure and quantify signal intensity.）

7）i）When an appropriate template has been saved previously:

Select “Open” from the “File” pull-down menu at the top left corner of the “Template Definition” window. Template files saved previously will appear. Select a template you want to use and press the “OK” button. The template（consisting of many red circles）will appear on the array image of the “Image view” window.（If the template is not fit to the spots on the image, select the “Alignment” menu in the “Template Definition” window, and apply the template to the spots according to the procedure described on and after step h）below.）

ii）When a template is newly created:

a）Select the “Layout” menu from the menus in the “Template definition” window. Click the “Change” button in the “Layout” menu.

b）Three items will appear. Set the “Field” selection to ‘multiple’ and the “Layer selection” to ‘one’. Fill in the

"row" with the number of fields（or the number of pens）and the "column" with the number of spot columns per field. Click the "OK" button.

c）Return to the "Layout" menu mentioned at step a）. Fill in the "Rows" with the number of all spot rows and the "Column" with the number of all spot columns.

d）Measure the diameter of one of the spots on the array image. A distance between a point and another point can be measured by drawing a straight line with the cursor when the "A-B" button（a button for measuring a distance）in another small window（"Layout" tool box）is pressed.（By drugging the cursor from the start point and then releasing it at the finishing point, the distance between those two points is measured.）First, measure the diameter of one of the spots. The diameter is displayed in the box of "Rows" or "Columns". Enter the value on the box of "Diameter" from the keyboard.

e）Next, measure the distance between a spot and another spot（the interval）in the row and column directions.（The interval of row means the distance from the top to the top（or the bottom to the bottom）of the upper and lower spots adjacent each other. The interval of column means the distance from the left end to the left end（or the right end to the right end）of the right and left spots adjacent each other.） The intervals of row and column are automatically entered in the boxes of "Rows" and "Columns" respectively by measuring it the same procedure as that mentioned at step d）.

f）In addition, select a circle in the "Element" box and click the "Create" button.

g）The "Element Starting Position" window will appear. Click the top left spot of the image in order to determine the start point of a template. Templates（many red circles）will appear in the image.

h）[Aligning the template with the positions of spots starts here.] Select the "Alignment" menu（a menu to align the templates with the spots）from the menus in the "Template definition" window. A green square frame（hereinafter called a green frame）will appear outside of the template on the array image.（The "Layout" tool box changes into the "Alignment" tool box.）

i）First, drug the right and left sides and the top side of the green frame（the cursor will change from an arrow into a bi-directional arrow）to adjust the template column so that it is aligned with the column of the spots.

j） Next, drug the bottom side of the green frame while pressing the control key on the keyboard to adjust the templates of the bottom row so that they are aligned with the spots of the bottom row.（By drugging the bottom side of the green frame while pressing the control key, templates corresponding to the number of fields are placed. By simply drugging the bottom side, the templates expands equally.）

k）The range of templates enclosed by the green frame can be easily changed. When the cursor is aligned with a simgle template and the template is clicked, the green frame encloses only the template. When another template is continuously clicked while pressing the shift key, a green frame enclosing two（or more）templates is created. By the same procedure, the green frames can be changed into any square and the templates can be enclosed. When you want to move all templates in the green frame as they are, align the cursor with the top left corner of the green frame（the cursor changes from an arrow into a cross）and drug the cursor. When you align the cursor with the top right corner of the green frame（the cursor changes into a bidirectional arrow like a bow）and drug the cursor, all the templates in the green frame rotate around the top left corner of the green frame. It is also available as another method to adjust the templates in the green frame to the position of spots by aligning and druging the cursor with one of the templates at the four corners of the green frame（the cursor changes into a V-shaped cursor）.

l）If the signals of the spots in the green frame is generally strong, templates and spots in the green frame are automatically aligned each other by roughly aligning the templates with the spots by the procedure described above and then by clicking one of the "Auto alignment"

buttons in the “Alignment” menu.（If the signals are not strong, however, “Auto alignment” may provide rather bad alignment. If you do not satisfy the result by auto-alignment, you can undo the auto-aligning when you push the “Undo” button just after performing the “Auto alignment”）

m）If the templates sand the spots are still not aligned each other, click the “Move individual template” icon（an icon carrying both a circle and an arrow）in the “Alignment” tool box displayed on the same screen, and then drug each template to align it with each spot.

n）Select the “Label” menu from the “Template definition” window. In this window, a number can be assigned to each spot.（In short, this is the setting for corresponding the array of each spot to the array of quantification data.）Using the left icon allows you to ‘assign each number in the row direction and column direction.’ Using the center icon allows you to ‘assign serial numbers from the top row to the bottom row in the direction of left to right in order.’ Using the right icon allows you to ‘assign serial numbers vertically.’

o）Select the “Background” menu in the “Template definition” window. Four items for selecting the position where background is set（set background outside of each template, set background outside of each spot, select spots for negative control and so forth, and select a range of no spot area）will appear. Select an item. Press the “Define” button and enter setup conditions.（The conditions you enter vary from item to item.）Consider the design of the array to be used and set up background.

p）Select the “Anchor/Blank” menu from the “Template definition” window. Set up the templates corresponding to the location where no spot has been attached as blank.（Quantification data are not calculated for these templates.）

（Templates will disappear during the work of steps o）or p）. Press the “Refresh” button to display the templates, and confirm where the backgrounds or the blanks has been set up. If any mistake is found, clear the mistake using the “Clear” button and set the items again.）

q）To save the created templates, select “Save as ” from the “File” pull-down menu in the upper portion of the “Template definition” window, and save the templates as a file name.

8）Click the “OK” button in the “Template definition” window.（Note: When a new templates have been created, if you perform this operation before saving the templates, the templates will be lost.）The “Image view” window remains and the “Sample” toolbox appears at the bottom left of the screen when the “Template definition” window and “Alignment” tool box have disappeared.

（If you want to return to some step and perform the work again, you can return to each step by operating the arrow head buttons in the lower left portion of the “Run:［Array Macro］” window.）

9）Move the cursor onto the image of the “Image view” window（the cursor will change into a square cursor consisting of four arrows）and click the image. The calculation of fluorescent intensity will start. The data list is displayed in the “Data” window behind the “Image view” window.

10）You may find “spots that cannot be used as data” in the array image because of dust or background. In such a case, you can make a distinction “the spots that cannot be used as data” by putting a mark（or a “flag”）in the “Image view” window after the calculation has been completed. First, click the “Flag” icon（a red V-shaped icon with a small black rectangle）, the second icon from the right in the “Sample” toolbox. The shape of the cursor will change into a red V character. Then, click the template corresponding to each spot. The template will automatically turn red.（A “flag” has been attached to the spot）. A “flag” is also attached to the box which corresponds to the spot, in the data list on the “Data” window.

11）Select the “File” menu from the pull-down menus at the top of the screen. Then, select “Save as...” from the “File” menu to save the file as a name. Both the final image and

the data list are saved in the file format specific to Array Vision. In addition, select "Export" from the "File" menu, give the data list the same file name that the two formers have, and save it in text format. In this case, only the data list is saved as a text file, in addition to the file of the data list saved in the ArrayVision file format.

9. Others

Confirmation of "reproducibility":

After completion of quantifying the intensity of fluorescence from a glass slide, examine the "reproducibility" of the data in the glass side. First, export a table of the fluorescence intensity measurements as a text file. Transfer this file to a spreadsheet software such as the Excel and make a scatter plot using the data of the left and right spot set on each glass slide. The data are judged to be "reproducible" when the quantified intensity of fluorescence is in a range from 0.5-2 times (or 1/3 - 3 times). Take one of the following steps when the microarray data have shown values above or below this range: (1) After the subsequent comparative analysis of the microarray data between RNA samples, validate the results of the comparative analysis by using other methods such as RT-PCR and Northern analysis.; (2) If the "reproducibility" of the data from a piece of glass slide is very low (e.g. the scattered plot shows round shape.), we recommend performing another exeriment using the same RNA sample.

Normalization:

Generally, the median value is used, or global normalization is performed. When a positive control (or positive controls) is used as reference for normalization, the normalization often turns out to be unsatisfactory. It is ideal to find multiple house-keeping genes (or their cDNAs), the expression quantities of which never change, from the probes on the array you used as internal positive controls and to use their signals for the normalization. In this case, you have to find the house-keeping genes in each experiment as references for normalization.

We do not use these positive controls as reference for normalization. These positive controls are useful to examine whether microarray experiment have been successful. In our Rice cDNA Array, insert DNAs of porcine EST clones that do not cross hybridize with rice cDNA are spotted as positive control clone (external positive control). And, in the preparation of the targets of hybridization, we simultaneously perform reverse transcriptase reaction by mixing cRNAs of these clones from porcine sources (in vitro transcripts) with each plant RNA sample. Therefore fluorescent signals of positive controls can be obtained as image data with signals of rice cDNA clones.

Comparative analysis of microarray data between samples:

Generally, the quantity of transcription is judged to have increased when the ratio of the intensity of fluorescence between the data compared is "2 or greater" and to have decreased when it is "0.5 or smaller" (sometimes use "3 or greater" and "1/3 or smaller"). Because these criteria are groundless from a statistic viewpoint, you have to validate microarray data using other methods such as RT-PCR and Northern analysis.

The simplest method for comparative analysis is to export data to spreadsheet software such as the Excel, as mentioned above, and to compare quantified data of the fluorescence intensity. The above-mentioned software (the Array Gauge and the MicroArray Suite) has functions of comparative analysis. Although not introduced here, several pieces of software are commercially distributed for comparative analysis such as the Spotfire (Spotfire), which links reciprocally each point on the scatter plot with gene information on the array, and the GeneSpring (Silicon Genetics), which can perform comparative analyses using statistical techniques such as principal component analysis.

Acknowledgement

This work was supported by a grant of the 21st Century

Green Frontier Research Project, Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries: “Functional Clarification of Useful Genes in Rice Genome Using Gene Expression Monitoring Techniques”（Assigned research subject: “Development of Monitoring Systems for the Expression of Rice Gene Groups”, project No. 1000）.

Summary

This article is a collection of protocols concerning the preparation and use of rice cDNA microarrays primarily used in the Microarray Project of MAFF. It includes protocols for the preparation of a large quantity of cDNA for microarrays, method for the use of the spotter, preparation of targets（method for fluorescent labeling of RNA）, hybridization, washing of glass slides, scanning of fluorescent signals, and quantification of image data. This collection of protocols will serve as a guide for microarray experiments and will help in the understanding of the microarray for the participants in this project and investigators interested in the microarray.

Reference books

Here are collections of manuals and protocols about microarray experiment. We recommend to refer these reference books（written in Japanese）.

1）Matsumura M. and Nanami H.（editorial supervision）2000. DNA Microarray and the Latest PCR Method. Special Issue of the Cell Technology. Genome Science Series（1）. pp. 133. Shujunsha, Tokyo.

2）Tsujimoto G. and Tanaka T.（editorial supervision）2000. Protocols of Genome Function Studies. Special Issue of the Experimental Medicine. Seminar of Experiments in the Post-Genome Era（1）. pp. 269. Yodosha, Tokyo.

3）Hayashizaki Y.（editorial supervision）and Okazaki, K.（editor）2000. Sure to Get data: Practical Manual of DNA Microarray. pp. 174. Yodosha, Tokyo.

4）Human Genome Analysis Center, University of Tokyo Institute of Medical Sciences（Laboratory of Dr. Yusuke Nakamura）(edit.) 2000. Microarray Volume. Labomanuals. pp. 43.（not for sale）

Reference

1）Yamamoto K, Sasaki T 1997. Large-scale EST sequencing in rice. Plant Mol Biol. 35: 135-144.

2）Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T, Sasaki T 2002. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. Plant Cell 14: 525-535.

Miscellaneous Publication of The National Institute of Agrobiological Sciences

No. 1

(December 2002)

CONTENTS

Yoshida S

Physiological and ecological studies on mulberry anthracnose …… 1

Fujii F, Shimbo K, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S

Protocols for experiments on rice cDNA microarray …… 79

ISSN 1347-9393

平成14年12月１日　印刷・発行

農業生物資源研究所研究資料　第１号

編集・発行　独立行政法人 農業生物資源研究所

〒305-8602　茨城県つくば市観音台２－１－２
電話　029（838）7832（情報資料課）
URL　http://www.nias.affrc.go.jp

印刷・製本　佐藤印刷株式会社

NIAS